

Alexandre Lemos de Souza

**ANÁLISE FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE *Cryptococcus*,  
ISOLADOS DE AMOSTRAS AMBIENTAIS DO MUNICÍPIO DE  
LAGES, SANTA CATARINA**

Dissertação submetida ao  
Programa de Pós Graduação em  
Biotecnologia e Biociências da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina como requisito parcial para  
obtenção do título de Mestre em  
Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Mario  
Steindel.

Florianópolis  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Souza, Alexandre Lemos de  
ANALISE FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE *Cryptococcus*,  
ISOLADOS DE AMOSTRAS AMBIENTAIS DO MUNICÍPIO DE LAGES,  
SANTA CATARINA / Alexandre Lemos de Souza ; orientador,  
Mario Steindel - Florianópolis, SC, 2016.  
78 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós  
Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. *Cryptococcus*  
neoformans. 3. Fungos. 4. PCR-RFLP. 5. Santa Catarina. I.  
Steindel, Mario. II. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e  
Biociências. III. Título.

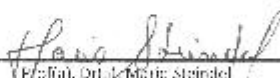


**"Análise fenotípica e genotípica de *Cryptococcus*, isolados de amostras ambientais do município de Lages, Santa Catarina"**

Por

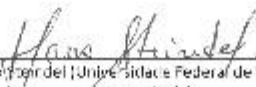
**Alexandre Leiros de Souza**

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (119/PPGBTC/2016) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.

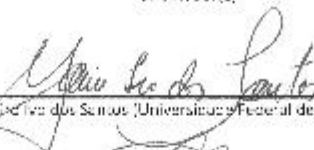


Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

Banca examinadora:



Dir(a) Maria Stindel (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Orientador(a)



Dir(a) Márcio Leão dos Santos (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dir(a) Thais Cristina Marques Sincero (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dir(a) Admil José Giacchini (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 14 de Junho de 2016.





Dedico este trabalho a minha família e aos meus amigos.









## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao Pai Celestial que sempre me iluminou e guardou, me deu forças e sempre olhou por mim durante toda minha caminhada.

Agradeço aos meus pais pela compreensão, pela força, pelo apoio, pelo colo, pela recepção toda vez que voltava para casa, pelo carinho e atenção quando eu mais precisei. Agradeço aos meus irmãos, Sandra, Alessandro, Adriano, que mesmo na minha ausência sempre me apoiaram, e mesmo distante nunca deixaram de estarem próximos. Amo vocês.

Aos meus amigos, que entenderam todas as minhas ausências nestes meses todos, aos aniversários não comparecidos, às reuniões que ficaram sempre para depois. Obrigado por me fazerem companhia mesmo estando a muitos quilômetros de distância. Agora, mais do que nunca, sei o quanto vale a amizade de vocês.

Ao Orientador Mário Steindel, pela oportunidade, pela coragem e pela dedicação, principalmente por não desistir. Obrigado.

Aos queridos do Laboratório de Meios da UFSC, o Gilmar, a Clarice e a Luiza, que me acolheram, me ouviram, me entenderam e me apoiaram e ajudaram nesta caminhada. Saibam que eu não esquecerei de vocês. Vocês foram parte deste capítulo da minha vida e boas lembranças eu tenho do ambiente descontraído que vocês proporcionavam. Vocês são demais. Obrigado por todo carinho e apoio.

A todos do Laboratório de Protozoologia pela convivência diária.

Agradeço a amiga Rosileia Quadros pelo incentivo em todos os sentidos, por sempre acreditar que poderia dar certo, às vezes, mais do que eu mesmo e por sempre me incentivar a buscar algo mais.

Ao Gustavo, que iniciou essa jornada, a Thaianna que sempre me ouviu nos momentos de fraqueza e alegria.

Agradeço em geral a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, que somaram, dividiram e contribuíram para que desse certo.

Agradeço aos proprietários das Fazendas, ao pessoal gentil do interior que sempre me recebeu tão bem quando o ‘menino dos pombos’ fazia as coletas.

Agradeço aos meus Chefes Maitê e Pedro pela disponibilidade para conclusão deste trabalho.

Agradeço ao programa pela oportunidade de realização do curso e a Capes pelo auxílio financeiro.

A todos vocês, **MUITO OBRIGADO!**



“Mas você tem que ter horas imperfeitas  
para ter as perfeitas. Você tem que matar dez horas  
para que duas vivam. O que você tem que cuidar é  
para não matar TODAS as horas, TODOS os anos.”  
Charles Bukowski



## RESUMO

O *Cryptococcus neoformans*, agente etiológico da criptococose é uma levedura encapsulada de distribuição mundial. A doença é oportunista para pacientes imunocomprometidos, mas também pode acometer indivíduos imunocompetentes. A infecção pelo fungo resulta de inalação de basidiósporos presentes no ambiente e pode causar infecção pulmonar sintomática ou assintomática autolimitada ou permanecer latente dentro de um granuloma. O fungo está classificado em três variedades: *C. neoformans* var *grubii* (sorotipo A) de distribuição mundial, *C. neoformans* var *neoformans* (sorotipo D) e *C. neoformans* var *gattii* (sorotipos B e C) e o híbrido sorotipo AD encontrados nas regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, as três variedades são reportadas como agentes etiológicos da criptococose em humanos. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência do fungo *Cryptococcus neoformans* em amostras ambientais na Serra Catarinense e avaliar a variabilidade genética dos isolados. Excretas de pombos (720 amostras) e folhas de eucalipto (240 amostras), foram coletas no período de Abril de 2014 a Março de 2016 em intervalo de 3 meses em 18 municípios da Serra Catarinense e processadas para isolamento do fungo em meio de cultura Níger cloranfenicol a 37°C. Foram isoladas 17 amostras, todas do município de Lages e a caracterização morfológica, produção de urease, produção de melanina e quimiotipagem em meio CGB permitiram identificar presuntivamente os isolados como pertencentes ao gênero *Cryptococcus*. A amplificação do gene CAP59 e a restrição do fragmento amplificado com as enzimas de restrição *AvaII* e *HaeIII* permitiu identificar todos os isolados com *C. neoformans* var. *grubii* tipo A e a tipagem molecular através de PCR-*fingerprinting* utilizando o iniciador M13 revelou que todas as amostras pertencem ao padrão molecular VNI. Os resultados mostram que apenas *C. neoformans* var. *grubii* tipo A, padrão molecular VNI foi identificado nas amostras ambientais na Serra Catarinense.

**Palavras chave:** *Cryptococcus neoformans*. CAP59. PCR-RFLP. PCR-*fingerprinting*. Serra Catarinense





## ABSTRACT

*Cryptococcus neoformans*, the causative agent of cryptococcosis is an encapsulated yeast-like fungus of worldwide distribution causing a common opportunistic infection on immunocompromised patients, but also affecting immunocompetent individuals. The infection occurs via inhalation of environmental basidiospores and may lead to symptomatic or asymptomatic pulmonary disease that can be often self-limited or remain latent within a granuloma in the lung. The fungus has three varieties as follows: *C. neoformans* var. *grubii* (serotype A) worldwide distributed, *C. neoformans* var. *neoformans* (serotype D) and *C. neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C), as well as the hybrid serotype AD are found in tropical and subtropical regions. Since human cryptococcosis in Brazil is caused by all three varieties, we have addressed in this study the occurrence and typing of *C. neoformans* obtained from environmental samples from the Serra Catarinense. Pigeon excreta (720 samples) and eucalyptus leaves (240 samples) were collected between April 2014 and March 2016 in a 3 months interval at the municipalities of the Serra Catarinense and processed for fungus isolation in Niger chloranphenicol medium at 37°C. A total of 17 samples were isolated from the municipality of Lages. Morphological characterization, urease and melanin production and chemotyping in CGB medium, led us to presumptively identify the isolates belonging to the genus *Cryptococcus*. The PCR/RFLP analysis of the CAP59 gene using *Hae*III and *Ava*II allowed identification of the isolates as *C. neoformans* var. *grubii* type A. Molecular typing using PCR-fingerprinting with M13 primer revealed that all samples belong to NIV molecular pattern. Our results indicate the exclusive presence of *C. neoformans* var. *grubii* type A VNI in environmental samples from the Serra Catarinense.

**Keywords:** *Cryptococcus neoformans*. CAP59. PCR-RFLP. PCR-fingerprinting. Serra Catarinense.



## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 – Fatores de virulência associados a célula de <i>Cryptococcus</i> .  | 30 |
| Figura 2 – Ciclo reprodutivo de <i>Cryptococcus</i> spp .....  | 35 |
| Figura 3 – Esquema de infecção do sistema nervoso central pelo <i>Cryptococcus</i> através do mecanismo de Cavalo de Tróia.....  | 36 |
| Figura 4 – Mapa do Estado de Santa Catarina, evidenciando a Serra Catarinense.....   | 40 |
| Figura 5 – Foto representativa das diferenças no tamanho da cápsula polissacarídica do fungo. Ao lado esquerdo, observa-se fungos com pequena produção de cápsula, enquanto a foto à direita evidencia uma grande produção de cápsula. Barra 10µm. ....  | 48 |
| Figura 6– Gel de agarose 1,5% corado pelo brometo de etídeo representativo da amplificação do gene CAP59 de amostras ambientais de <i>Cryptococcus neoformans</i> isolados de excreta de pombos do município de Lages. PM = DNA de PUC18 clivado com a endonuclease <i>HaeIII</i> ; 1- Controle negativo (sem adição de DNA); 2- Controle positivo cepa LMM794; 3 a 8 – Amostras isoladas...       | 50 |
| Figura 7– Gel de poliacrilamida 6% corado pelo brometo de etídeo representativo da digestão do fragmento amplificado de 597 pb do gene CAP59 pelas endonucleases de restrição <i>AvaII</i> e <i>HaeIII</i> . 1 – 100pb Ladder; 2 – Sorotipo A. 3 – Sorotipo D. 4 – Sorotipo AD. 5 a 9 – Amostras Isoladas. ....  | 51 |
| Figura 8 – Gel poliacrilamida 6% corado pelo brometo de etídeo representativo do perfil de PCR-fingerprinting obtido com iniciador M13 das amostras padrão e de amostras isoladas de <i>Cryptococcus neoformans</i> . 1 – DNA de PUC18 clivado com a endonuclease <i>HaeIII</i> ; 2 – VNI; 3 – VNII; 4 – VNIII; 5 – VNIV; 6 – VGI; 7 – VGII; 8 – VGIII; 9 – VGIV; 10 e 11 – Amostras Isoladas..... | 51 |



## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1- Amostras ambientais (excreta de pombos e folhas de Eucalipto) coletadas em diferentes municípios no período de Abril de 2014 a Março de 2016 submetidas a cultura para isolamento de <i>Cryptococcus</i> spp..... | 47 |
| Tabela 2– Caracterização morfológica e bioquímica de amostras de <i>Cryptococcus</i> isoladas.....  | 49 |



## LISTA DE ABREVIACÕES

|       |   |
|-------|---|
| Aids  | – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida                |
| CDC   | – <i>Center for Disease Control</i>                     |
| CGB   | – Canavanina-Glicina-Azul-de-bromotimol                 |
| DAQ   | - Orto-dopacromo  |
| DHN   | - 1,8-dihidroxinaftaleno                                |
| DNA   | – Ácido Desoxirribonucléico                             |
| DOPA  | - Diidroxifenilalanina                                  |
| FECAM | – Federação Catarinense dos Municípios                  |
| GalXM | - Galactoxilomanana                                     |
| GHB   | - Glutaminil-4-hidroxibenzeno                           |
| GXM   | - Glicuronoxilomanana                                   |
| HIV   | – Vírus da Imunodeficiência Humana                      |
| HSP   | – Proteínas de Choque Térmico                           |
| IBGE  | – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística       |
| IDH   | – Índice de Desenvolvimento Humano                      |
| NK    | – Natural Killer  |
| Pb    | – Pares de Base   |
| PCR   | – Reação em Cadeia da Polimerase                        |
| RFLP  | – Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição |
| SDA   | – Sabouraud Dextrose Agar                               |





## SUMÁRIO

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| <b>1</b>   | <b>INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>25</b> |
| 1.1        | HISTÓRICO .....  | 26        |
| 1.2        | O ORGANISMO E SEUS FATORES DE VIRULÊNCIA .....                         | 29        |
| 1.3        | CICLO REPRODUTIVO DO FUNGO .....                                       | 33        |
| 1.4        | PATOGENIA .....  | 35        |
| 1.5        | DIAGNÓSTICO .....  | 37        |
| 1.6        | SERRA CATARINENSE .....  | 39        |
| <b>2</b>   | <b>OBJETIVOS.....</b>  | <b>41</b> |
| 2.1        | OBJETIVO GERAL .....   | 41        |
| 2.2        | OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....   | 41        |
| <b>3</b>   | <b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>   | <b>42</b> |
| 3.1        | COLETA DAS AMOSTRAS .....  | 42        |
| <b>3.2</b> | <b>PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS OBTIDAS .....</b>                        | <b>43</b> |
| 3.2.1      | ISOLAMENTO DO FUNGO EM EXCRETAS DE<br>AVES .....                       | 43        |
| 3.2.2      | ISOLAMENTO DO FUNGO EM AMOSTRAS DE<br>FOLHAS .....                     | 43        |
| 3.2.3      | ESTOQUE E MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS<br>.....                             | 43        |
| 3.2.4      | DETERMINAÇÃO FENOTÍPICA.....   | 43        |
| 3.2.4.1    | VERIFICAÇÃO DE FATORES DE<br>VIRULÊNCIA.. .....                        | 44        |
| 3.2.4.1.1  | PRESENÇA DE CÁPSULA POLISSACARÍDICA<br>.....                           | 44        |
| 3.2.4.1.2  | PRESENÇA DE UREASE .....   | 44        |
| 3.2.4.1.3  | CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE MELANINA<br>.....                            | 44        |
| 3.2.5      | QUIMIOTIPAGEM COM MEIO DE CULTURA<br>.....                             | 44        |
| 3.2.6      | AMPLIFICAÇÃO DO GENE CAP59 .....                                       | 45        |
| 3.2.7      | PURIFICAÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO<br>DO FRAGMENTO DO GENE CAP59 ..... | 45        |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 3.2.8    | TIPAGEM MOLECULAR DAS AMOSTRAS POR PCR-RFLP .....  | 46        |
| 3.2.9    | DETERMINAÇÃO DOS SUBGRUPOS POR PCR-FINGERPRINTING .....  | 46        |
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS .....</b>  | <b>46</b> |
| 4.1      | COLETA DE AMOSTRAS .....   | 46        |
| 4.2      | CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DOS ISOLADOS: PRESENÇA DE CÁPSULA, PRODUÇÃO DE MELANINA E CRESCIMENTO A 37°C ..... | 48        |
| 4.3      | CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS QUANTO A PRODUÇÃO DE UREASE.....   | 49        |
| 4.4      | QUIMIOTIPAGEM EM MEIO DE CULTURA.....  | 49        |
| 4.5      | CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS POR PCR .....  | 50        |
| 4.6      | IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS POR PCR-RFLP .....  | 50        |
| 4.7      | FINGERPRINTING.....  | 51        |
| <b>5</b> | <b>DISCUSSÃO.....</b>  | <b>53</b> |
| <b>6</b> | <b>CONCLUSÃO.....</b>  | <b>59</b> |
| <b>7</b> | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>  | <b>59</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

O *Cryptococcus* é uma levedura capsulada, encontrada no meio ambiente, com potencial patogênico tanto para humanos quanto para animais. Na natureza, pode ser encontrado na forma leveduriforme quando em estado parasitário ou em forma filamentosa, dependendo das condições ambientais (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; REY et al., 2000).

A inalação de esporos produzidos por esta levedura, associada a problemas com a imunidade do hospedeiro reforçam a teoria de que indivíduos imunocomprometidos são mais susceptíveis ao desenvolvimento da criptococose, doença causada pelo fungo. Deste modo, como o patógeno está presente no ambiente, a inalação dos esporos provoca infecção inicial assintomática nos pulmões, podendo permanecer latente ou até mesmo infectar o Sistema Nervoso Central (CASADEVALL; PERFECT, 1998; KAWAKAMI, 2004).

Em território nacional, há descrição do fungo em quase todos os estados, tanto de amostras clínicas quanto de amostras de origem ambiental. Para elucidação da epidemiologia desta levedura, se faz necessário estudos mais amplos do comportamento da levedura nas diferentes regiões do país, abrangendo locais ainda não explorados.

O potencial apresentado pela região Serrana de Santa Catarina na indústria madeireira desperta interesse na busca por amostras desta fonte ambiental, notório tamanho que esta indústria possui para o desenvolvimento da região. O objetivo de classificar o fungo de acordo com padrões conhecidos reforça o propósito de fornecer dados para estudos posteriores. Os maiores produtores de madeira na região serrana são os municípios de Correia Pinto, Lages e Otacílio Costa, os quais foram submetidos a coleta de amostras de excretas presentes nas plantas de Eucalipto, visando o isolamento do fungo.

Excretas depositadas em locais abrigados de luz e calor são frequentemente descritos como reservatório desta levedura, sendo as aves, principalmente os pombos, os principais animais ligados a esta doença. Estes animais, em decorrência da busca por abrigo e alimento, migram para diferentes locais disseminando o fungo através de seus bicos, penas e pernas (FILIÚ et al., 2002). Madeira em decomposição e partes ocas de árvores nativas também já foram descritas como habitat para a levedura (FILIÚ et al., 2002).

A região estudada, apesar da grande quantidade de municípios, é pouco desenvolvida. A agricultura é de subsistência e os produtores ainda possuem condições precárias de estocagem das suas culturas. Nos

municípios menores, a infestação de pombos é rara, porém, estes se concentram nos galpões dos produtores se alimentando dos restos que lhes sobra.

Nos maiores municípios, como Lages e São Joaquim, a quantidade de pombos em locais públicos é elevada. É possível encontrar ninhos e pombos por vários lugares, nas praças, nos prédios públicos e em prédios abandonados. Estes locais também foram submetidos a coletas para isolamento do *Cryptococcus*.

Tendo o predomínio do sorotipo A nas regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste, ainda não há estudos amplos que confirmem esta afirmação na região serrana, esta que apresenta clima diferenciado, com temperaturas negativas durante o inverno e temperaturas acima de 30 °C no verão.

De forma geral, trabalhos sobre a classificação molecular de *C. neoformans* a partir de amostras ambientais são bastante escassos, principalmente em regiões específicas. Considerando então que a região serrana de Santa Catarina é um polo a ser explorado, tendo em vista a capacidade de produção madeireira e a rápida expansão das áreas de florestamento, sabe-se que a população de pombos aumenta a cada ano, possibilitando a disseminação do fungo por outras regiões.

## 1.1 HISTÓRICO

O *Cryptococcus* é uma levedura capsulada e apresenta-se na forma leveduriforme quando encontrada em estado parasitário ou ambiental e de forma filamentosa em diferentes condições ambientais (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; REY et al., 2000). A levedura é envolvida por uma cápsula polissacarídica e mede cerca de 4 a 10 micrometros de diâmetro, podendo chegar até 80 micrometros. A levedura é produtora de urease, assimila manitol e não fermenta carboidratos (CASADEVALL; PERFECT, 1998; MA; MAY, 2009). O *Cryptococcus* é o agente causal da criptococose, uma zoonose transmitida pelos pombos, de distribuição cosmopolita e que normalmente está associada a pacientes imunocomprometidos (COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014).

No final do século XIX foram iniciados os estudos da levedura no ambiente. Os primeiros isolados a partir de excreta de aves, material seco proveniente de árvores e madeira em decomposição ganharam destaque, fomentando a discussão de que a origem da infecção era ambiental. Do mesmo modo, o isolamento do fungo a partir de lesões humanas e animais

fortaleceu o potencial patogênico desta levedura (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992).

A criptococose humana foi descrita inicialmente por Otto Busse e Abraham Buschke de forma clínico-patológica no ano de 1894, a partir de estudos com uma mulher de 31 anos de idade que se queixava de uma lesão na perna (KNOKE; SCHWESINGER, 1994). O isolamento deste patógeno para estudo foi comparado a outros e posteriormente denominado *Saccharomyces hominis* (KNOKE; SCHWESINGER, 1994; HEITMAN et al., 2011).

Sanfelice (1894), isolou no mesmo ano leveduras que apresentavam uma cápsula em seu envoltório a partir de um suco de pêssego que sofrera fermentação. Um ano depois, provou sua patogenicidade em animais de laboratório e nominou a espécie como *Saccharomyces neoformans* (CASADEVALL; PERFECT, 1998; BARNETT, 2010).

Curtis (1995) isolou o fungo a partir de uma lesão localizada no quadril de uma mulher e a este isolado nominou *S. subcutaneous tumefaciens*. Ainda em 1995, Curtis isolou uma outra levedura de um paciente que sofria de meningite, denominando o patógeno como *Megelococcus myxoides*, e este se tornaria o primeiro relato de meningite associada ao *Cryptococcus spp* (BARNETT, 2010).

No ano de 1901, Vuillemin estudou o fungo o isolando de amostras de lesões pulmonares de suínos e de leite bovino, constatando que se tratava de leveduras esféricas e encapsuladas, afirmando que os isolados se tratavam do mesmo gênero que as leveduras isoladas anteriormente pelos demais pesquisadores e o gênero foi então renomeado como *Cryptococcus*. No mesmo ano, percebeu que havia diferenças na presença de estruturas que classificassem este novo gênero e classificado como *C. hominis* e *C. neoformans*, que se baseava na incapacidade de fermentação de carboidratos e de produzir ascósporos, o que diferencia *Cryptococcus* de *Saccharomyces* (HEITMAN et al., 2011).

Emmons (1951), dedicou suas pesquisas na elucidação da relação entre o fungo e as fontes ambientais, como excretas de pombos da espécie *Columbia livia* e madeira em decomposição. Já a pesquisa de Staib (1962), descreveu os aspectos fisiológicos do gênero *Cryptococcus*, percebendo que o fungo quando cultivado em meio de cultura contendo as fezes de pombos ou sementes de níger (*Guizotia abyssinica*) apresentavam pigmento escuro, tornando possível a diferenciação do *Cryptococcus* entre os outros fungos cultivados. Em 1972, o estudo de Shaw e Kapica revelou a identidade do pigmento como sendo melanina (BARNETT, 2010).

Em 1970, um caso de meningoencefalite relatado por Gattii e Eckels era causado por um isolado semelhante a *C. neoformans*, no entanto, sua morfologia era diferente, de formato alongado, sendo considerado uma nova variedade e foi denominada de *C. neoformans* variedade *gattii* (HEITMAN et al., 2011; KWON-CHUNG; BENNETT, 1978).

Shadomy (1970), observou fíbulas no isolamento deste fungo, sugerindo que o mesmo pertencia ao grupo dos basidiomicetos, justamente pela manutenção da condição dicariótica no desenvolvimento (SHADOMY et al., 1970; CASADEVALL, PERFECT, 1998)

Na Austrália, no ano de 1990, Ellis e Pfeiffer isolaram a variedade *gattii* a partir de tronco de eucalipto em decomposição. O isolamento a partir de outras espécies de árvores e madeiras em decomposição foram evidenciados, como também em excretas de pombos e outras aves, inclusive no Brasil (CHEE; LEE, 2005; KOBAYASHI et al., 2005; LÁZERA et al., 2000; LÁZERA; WANKE; NISHIKAWA, 1993; PEDROSO; FERREIRA; CANDIDO, 2009). Em virtude destes estudos, a proposta de que as cepas dessa variedade diferiam da variedade *neoformans* foi aceita e no ano de 2002, através de um estudo filogenético e avaliação de características ecológicas e bioquímicas, a variedade *gattii* passou a ser considerada uma nova espécie de *Cryptococcus* (HEITMAN et al., 2011).

Com base em análises epidemiológicas, ecológicas, fisiológicas, fenotípicas e através de uma reação de aglutinação utilizando antissoros produzidos contra componentes da cápsula polissacarídica do fungo, o *C. neoformans* foi classificado em cinco sorotipos diferentes (A, B, C, D e AD), sendo denominados *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A), *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) e *C. neoformans* var. *gattii* (sorotipos B e C). O sorotipo AD foi classificado como sendo um híbrido diploide (IKEDA et al., 1982; NISHIKAWA et al., 2003; D'SOUZA et al., 2004). Estudos filogenéticos sugerem que os sorotipos B e C se diferenciaram das outras espécies em cerca de 37 milhões de anos, e que o sorotipo A e D divergem em cerca de 19 milhões de anos (XU; VILGALYS; MITCHELL, 2000; MARRA et al., 2004).

Com a evolução das técnicas de biologia molecular, a possibilidade de sequenciar os genomas dos microorganismos, e o sequenciamento das cepas JEC21, H99, WM276 e R265 de *C. neoformans* e *C. gattii*, foi possível classificar estas espécies em nove genótipos diferentes VNI, VNII, VNIII, VNIV, VNB, VGI, VGII, VGIII e VGIV) (HEITMAN et al., 2011).

No Brasil, Lacaz identificou o primeiro isolado do fungo em humanos no ano de 1941. Em seguida, em 1944, Almeida conseguiu o mesmo feito (REIS-FILHO et al., 1985; PAPPALARDO; MELHEM, 2004).

## 1.2 O ORGANISMO E SEUS FATORES DE VIRULÊNCIA

Os fungos são seres vivos com organização celular e DNA delimitado por um envoltório nuclear. Este grupo de seres vivos apresenta ampla diversidade na natureza, e sua grande maioria vive de forma saprofítica, sendo também encontrados vivendo de forma parasitária ou simbiótica (LACAZ et al., 2002). Estes, normalmente apresentam propriedades nutricionais pouco exigentes e são metabolicamente versáteis (SIDRIM; MOREIRA, 1999).

Estes organismos produzem metabólitos secundários, como substâncias tóxicas e, por estarem presentes em grande número na natureza, são frequentemente encontrados em plantas, causando patologias e danos em alimentos e plantações (LACAZ et al., 2002). Das mais de cem mil espécies de fungo existentes, apenas 0,1% destas infectam humanos (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992, RICHARDSON; WARNOCK, 1993).

As novas técnicas de isolamento e identificação dos fungos permitiram conhecer as espécies de forma mais ampla, classificando os fungos como causadores de micoses e micetomas em humanos, embora também sejam encontrados de forma transitória na superfície da pele (LACAZ et al., 2002).

Infecções oportunistas são frequentemente relatadas em indivíduos transplantados, pacientes com AIDS e imunocomprometidos de alguma maneira, por exemplo com o uso de medicamentos como corticoides e antineoplásicos (FERNANDES et al., 2003; DARZÉ et al., 2000).

Dentre estas infecções, a Criptococose, micose causada pelos fungos do gênero *Cryptococcus*, é relatada como uma das micoses mais frequentes nos indivíduos imunocomprometidos. Os agentes etiológicos desta, *C. neoformans* e *C. gattii*, são encontrados em excretas de pombos e demais aves, em matéria orgânica em decomposição como a madeira e folhas secas de árvores (SILVA; CAPUANO et al., 2008; FILIÚ et al., 2002; FERNANDES et al., 2003).

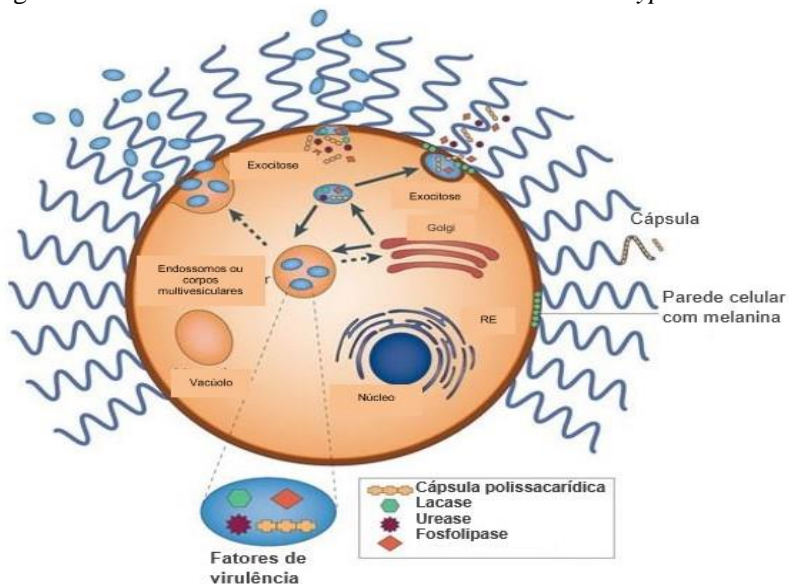
Atualmente, cerca de 70 espécies do gênero *Cryptococcus* são conhecidas. Dessas, apenas duas são consideradas relevantes quanto a infecção e patogenicidade, *C. neoformans* e *C. gattii* (KURTZMAN; FELL;

BOEKHOUT, 2011; MA; MAY, 2009). Segundo Kurtzman, Fell e Boekhout (2011), a classificação taxonômica do fungo acontece na sua fase teleomórfica, pertencendo ao reino *Fungi*, filo *Basidiomycota*, ordem *Tremellales*, família *Tremellaceae* e gênero *Filobasidiella*. São descritas *Filobasidiella neoformans* var. *neoformans* para *C. neoformans* e *Filobasidiella neoformans* var. *bacillispora* para *C. gattii*.

Diversos fatores foram descritos como facilitadores da infecção humana por tais fungos, sendo eles a presença de uma cápsula composta por polissacarídios com propriedades antifagocitárias (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; CHANG; PENOYER; KWON-CHUNG, 1996), a produção de melanina como agente antioxidante (WANG et al., 1995; TUCKER; CASADEVALL, 2002), produção de urease (COX et al., 2000), a habilidade de crescimento a 37°C (CASADEVALL; PERFECT, 1998) e a especificidade de genes sexuais com locus MAT $\alpha$  e MAT $\alpha$  (KWON-CHUNG; EDMAN; WICKES, 1992).

Assim como os demais organismos vivos, o *Cryptococcus* apresenta estratégias de sobrevivência no ambiente, e os fatores de virulência são conhecidos por desempenhar funções essenciais na patogenicidade desse fungo (Figura 1) (GARCIA-RIVERA; CASADEVALL, 2001).

Figura 1 – Fatores de virulência associados a célula de *Cryptococcus*.





A cápsula foi o primeiro fator de virulência de *Cryptococcus* a ser descrito como associativo à patogenia e é considerado como essencial (MA; MODY, 2002). A cápsula deste organismo serve como proteção contra amebas e contra a desidratação, além de agir como imunomodulador e agressor intracelular (AKSENOV, 1973; KOZEL, et al. 1988; STEENBERGEN, et al., 2001). Os propágulos fúngicos não possuem cápsula, mas ao serem depositados nos alvéolos, uma rápida síntese capsular ocorre, estimulando a levedura a produzir o envoltório (GILES et al., 2009; VELAGAPUDI et al., 2009).

A glicuronoxilomanana (GXM) é o principal constituinte da cápsula polissacarídica do *Cryptococcus*, apresentando um tamanho molecular de aproximadamente  $1,5 \times 10^6$  daltons (GATES; THORKILDSON; KOZEL, 2004). É composta por D-manopiranosana contendo cadeias simples de xilose e cargas residuais de ácido glicurônico (CHERNIAK; NEILL; SHENG, 1998). Além da glicuronoxilomanana, a cápsula possui outros constituintes, como a galactoxilomanana (GalXM) e manoproteínas (MCFADDEN et. al., 2006; FRASES et. al. 2008).

Jesus et. al. (2010) estudaram os constituintes da cápsula por meio de anticorpos monoclonais conjugados a fluoróforos e levantaram a hipótese de que a GalXM e as manoproteínas são constituintes de parede, e não de cápsula, sendo a GXM o principal polissacarídeo que compõe o envoltório. No entanto, há sugestões de que há mais um componente na estrutura capsular, quando detectaram um beta-glicano associado à cápsula (COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014)

Em condições ambientais, a produção da cápsula é bastante afetada (ZARAGOZA; CASADEVALL, 2004). Em locais onde são frequentemente expostos aos agentes externos como luz solar, umidade e altas temperaturas, o fungo pode aumentar a produção da cápsula, deixando-a mais espessa. O mesmo acontece quando este fungo infecta seres humanos em virtude da ação do organismo em combater a infecção (MA; MAY, 2009). Em cultivo *in vitro*, o alargamento capsular pode ser induzido por diversos fatores, como altas concentrações de CO<sub>2</sub> ou baixas concentrações de ferro (GRANGER; PERFERCT; DURACK, 1985; VARTIVARIAN et al., 1993).

Os componentes da cápsula polissacarídica, em especial a GXM, são fundamentais na modulação da resposta imune como na inibição da fagocitose pelos macrófagos, alteração na produção de citocinas e neutralização de opsoninas (COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014), inativação da via clássica do sistema complemento (MERSHON-SHIER et al., 2011) e inibição da produção de anticorpos (VECCHIARELLI, 2013).

A deleção de genes essenciais na produção da cápsula resultou em mutantes sem cápsula e com baixa capacidade de virulência ou até avirulentos, como o CAP10 (CHANG; KWONCHUNG, 1999), o CAP59 (CHANG; KWON-CHUNG, 1994), o CAP60 (CHANG; KWON-CHUNG, 1998) e o CAP64 (CHANG; PENOYER; KWON-CHUNG, 1996).

A enzima lacase é utilizada pelo fungo para a degradação de lignina e atua na interferência da ação antioxidante (LAZERA, et al., 1996; LIU; TEWARI; WILLIAMSON, 1999). Os precursores dopaminérgicos do fungo são captados do meio extracelular e com o auxílio da enzima lacase associada à membrana celular, sintetizam a melanina (ZHU et al., 2001). A lacase produzida pelo *C. neoformans* dispõe de duas isoformas, uma abundantemente, expressa na parede (Lac1) e a outra (Lac2) presente no citoplasma. Apesar de Lac1 desempenhar um papel fundamental na virulência, é necessária a atuação de ambas para contribuir de maneira sinérgica na infecção (MISSALL et al., 2005; PUKKILA-WORLEY et al., 2005). Casos de virulência reduzida podem ocorrer quando cepas mutantes são deficientes na produção de lacase, sendo consequentemente, deficientes na gênese da melanina (COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014; LIU; NIZET, 2009; NGAMSKULRUNGROJ; MEYER, 2009).

A melanina é utilizada como proteção contra os raios solares (STEENBERGEN, et al., 2001), permite a tolerância a variação de temperatura (WANG; CASADEVALL, 1994; WANG; AISEN; CASADEVALL 1995), além da redução da degradação enzimática do hospedeiro (GARCIA-RIVERA; CASADEVALL, 2001). É eficiente contra metais pesados e amebas, e confere ao fungo resistência à morte oxidativa (HUFFNAGLE et. al., 1995; VAN DUIN; CASADEVALL; NOSANCHUK 2002).

A capacidade de absorver radiação eletromagnética oriundas de fontes ultravioleta ou de reatores nucleares confere radioproteção para o fungo no meio ambiente (DADACHOVA et al., 2008). A melanina ainda pode interferir na fagocitose, na defesa contra radicais livres produzidos pelo hospedeiro durante a infecção, e na capacidade de difusão do fungo para outros tecidos, principalmente o sistema nervoso central. Em decorrência da presença de melanina na cápsula, as células melanizadas são mais resistentes a anfotericina B e a caspofungina (COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014).

A produção de melanina acontece quando o fungo é cultivado em ágar contendo compostos difenólicos (POLACHECK; HEARING; KWON-CHUNG, 1982; CHANG et al., 2000). Quatro precursores

derivam os tipos de melanina encontrados nesses fungos, sendo eles a diidroxifenilalanina (DOPA); glutaminil-4-hidroxibenzeno (GHB); catecol e 1,8-dihidroxinaftaleno (DHN), que formarão a DOPA-melanina, a GHB melanina, a Catecol-melanina e a DHN-melanina, respectivamente (BUTLER; DAY, 1998). Os fungos do gênero *Cryptococcus* são conhecidos pela produção da DOPA-melanina e tem como seu intermediário o orto-dopacromo (DAQ) (ZHU; WILLIAMSON, 2004).

A fosfolipase desempenha ação nutricional, como também ação de proteção contra agentes ameboides e tem função direta no crescimento intracelular (GHANNOUM, 2000; COX et al., 2001; STEENBERGEN et al., 2001). Esta enzima compreende um grupo heterogêneo que é capaz de hidrolisar éster de glicerofosfolipídeos, resultando na degradação de fosfolipídeos da membrana das células do hospedeiro, levando a lise celular (MA; MAY, 2009). A principal fosfolipase produzida pelo *Cryptococcus* é a fosfolipase B (Plb1). A Plb1 permite o acesso do fungo ao citoplasma e aos seus componentes pela lesão da membrana fagossomal, aumentando a captação de nutrientes (COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014).

As proteases possuem função nutricional e são facilitadoras de lesão tecidual (AKSENOV, 1973; STEENBERGEN, et al 2001). As proteases clivam as ligações peptídicas resultando na digestão de proteínas, permitindo a captação de nutrientes (MA; MAY, 2009). Os principais alvos da atividade proteolítica são o colágeno, a elastina, o fibrinogênio, as imunoglobulinas e os fatores complemento (CHEN; et.al.,1996).

As ureases proporcionam o crescimento intracelular (COX, et al., 2000). Algumas mudanças fenotípicas e a adaptação de cepas ao estresse ambiental são regulados pela 33iniss (GOLDMAN et.al. 1998; FRIES et al., 2001). Além disso, a 33iniss catalisa a hidrólise de uréia em amônia e carbamato, derivando uma alcalinização do meio, facilitando a absorção de nutrientes. Sugere-se ainda, que além da função nutricional, a 33iniss também esteja ligada ao rompimento de tecidos e da barreira hematoencefálica facilitando a disseminação do fungo (COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014).

### 1.3 CICLO REPRODUTIVO DO FUNGO

Duas são as formas com que o fungo *Cryptococcus* pode se reproduzir: assexuada ou sexuadamente. A forma sexuada ainda não foi evidenciada no meio ambiente, mas vem sido amplamente demonstrada

em condições laboratoriais. A fase teleomórfica da espécie é denominada *Filobasidiella neoformans* (KWON-CHUNG 1975, 1976<sup>a</sup>, 1976b). A grande característica do patógeno é conter hifas dicarióticas, ou seja, possuir origens diferentes, possibilitando também a formação de estruturas de manutenção do estado e de longas cadeias de basidiósporos (KWON-CHUNG 1975).

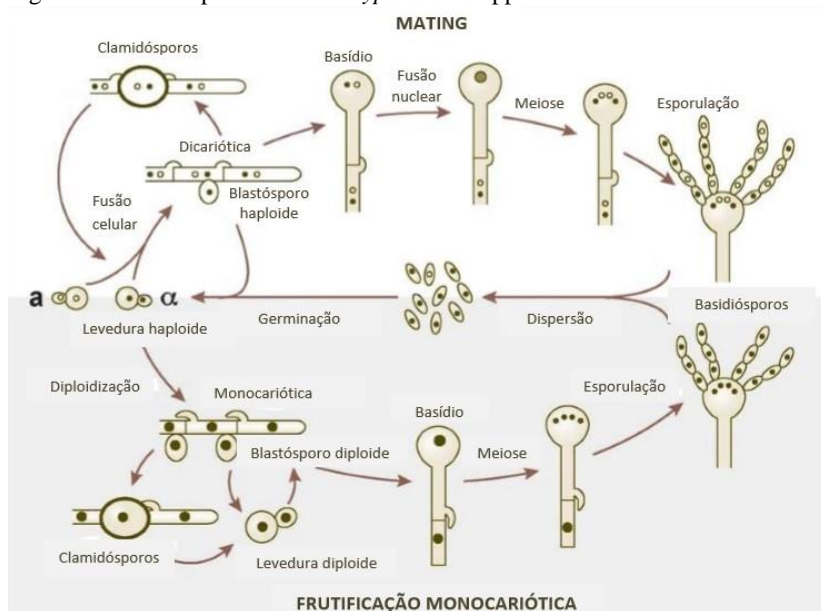
A ocorrência da reprodução sexuada depende de uma compatibilidade bipolar, ou seja, necessita de alelos opostos, MAT $\alpha$  e MATa (KWON-CHUNG; HILL; BENNETT, 1981; ALSPAUGH; DAVIDSON; HEITMAN, 2000; LENGELER et al., 2000; MARRA et al., 2004).

McCLELLAND et al. (2004) evidenciaram as diferenças entre os ciclos sexuais do *Cryptococcus* e de outros fungos. As características do ciclo sexual são únicas e o locus sexual é extenso e possui resposta específica aos feromônios. Outro fator importante é que esses genes sexuais exercem funções diferentes em células MATa e MAT $\alpha$ , normalmente quando há carência de nitrogênio (Figura 2).

Quando o feromônio Mfa é secretado pela célula MATa e as células MAT $\alpha$  respondem produzindo o feromônio MF $\alpha$ , desencadeiam o início da formação dos tubos de conjugação. Esses tubos permitem a migração de uma das partes da divisão do núcleo da célula MAT $\alpha$ . Ao mesmo tempo, uma célula MATa também sofre divisão nuclear e desencadeia a formação da hifa. A hifa recebe núcleos de ambos os sexos e faz a captação da mitocôndria produzida pela célula MATa, enquanto a mitocôndria das células MAT $\alpha$  é destruída. A seguir, ocorre a separação das hifas pela célula MATa e ocorre o desenvolvimento dos filamentos dicarióticos (McCLELLAND et al., 2004). Na natureza, as formas assexuadas são encontradas normalmente, mas a prevalência ocorre em células MAT $\alpha$  em decorrência da formação de frutificações em resposta a ausência de nitrogênio em células MATa (TSCHARKE et al., 2003).

Os *mating types* são fatores reguladores de reprodução sexual desses fungos (WICKES, 2002). O cálcio e a sinalização de Camp são responsáveis pelo desenvolvimento e reprodução e também são descritos como um fator regulador da virulência (CRUZ; FOX; HEITMAN, 2001; D'SOUZA; HEITAMN, 2001).

Figura 2 – Ciclo reprodutivo de *Cryptococcus* spp



Fonte: Adaptado de Lin, Heitman, (2006)

## 1.4 PATOGENIA

A infecção em humanos pelo fungo *Cryptococcus* está relacionada com a inalação de esporos e a disfunção da imunidade inata do hospedeiro. Como estão presentes no ambiente, são facilmente inalados e podem causar infecção inicial assintomática na porção subpleural dos pulmões, ou ainda, permanecer latente em um granuloma (CASADEVALL; PERFECT, 1998; KAWAKAMI, 2004). No entanto, levando em consideração o estado do hospedeiro e os fatores de virulência, a infecção pode se estender para outros órgãos (BICANIC; HARRISON, 2005).

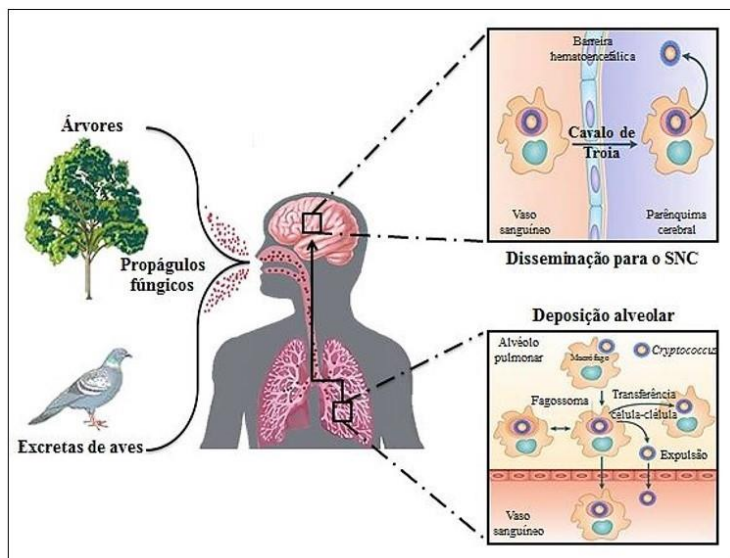
A variação nas manifestações clínicas da doença inclui desde infecções pulmonares, nódulos, até disseminação sistêmica. A intensidade da infecção é regulada pela resposta imune do hospedeiro, bem como a virulência da cepa. O acometimento dos pulmões está mais relacionado a pacientes imunocomprometidos (LALLOO; AMOD, 2005). Por outro lado, a meningite criptocócica está diretamente ligada a pacientes com AIDS ou pacientes que se encontram em tratamento com

imunossupressores ou que sofrem com desordens linfoproliferativas (THOMPSON, 2005; BICANIC; HARRISON, 2005).

O contato das células de defesa com o fungo, principalmente as células *natural killer* (NK), linfócitos T CD4 e T CD8, e principalmente macrófagos, revelam uma defesa do tipo Th1 com intensa produção de fator de necrose tumoral, interferon gama e interleucinas. Em pacientes imunocompetentes, a doença é autolimitada ou latente, e em pacientes imunocomprometidos, pode ocorrer lesão pulmonar primária e a infecção se espalhar por órgãos secundários como a pele, ossos, e principalmente, o sistema nervoso central (KON et al., 2008; GULLO et al., 2013).

Em decorrência da infecção no sistema nervoso central (SNC), são frequentemente relatados casos de meningoencefalite, meningite criptocócica e encefalite, todas com altas taxas de mortalidade (ELLIS et al., 2000; KAWAKAMI, 2004). Acredita-se que a infecção e disseminação da doença ocorra por um mecanismo conhecido como Cavalo de Tróia (Figura 3), onde o fungo é carregado para dentro dos macrófagos que conseguem ultrapassar a barreira hematoencefálica, causando posteriormente a meningite, meningoencefalite, com evolução de curso fatal se não tratada (GULLO et al., 2013; KON et al., 2008).

Figura 3 – Esquema de infecção do sistema nervoso central pelo *Cryptococcus* através do mecanismo de Cavalo de Tróia.



O aumento dos casos de AIDS despertou o interesse dos pesquisadores ao redor do mundo a partir de 1981, onde de 5 a 10% dos pacientes que eram portadores do vírus HIV desenvolveram criptococose, o que significava a maioria dos casos reportados na literatura até 1981 (CDC, 2003). Nos países desenvolvidos, como os Estados Unidos, por exemplo, 85% dos casos reportados de infecção pelo fungo eram de pacientes portadores de HIV (CDC, 2003). Nos dias atuais, uma avaliação mais completa de co-infecção por HIV é necessária nos casos suspeitos de criptococose.

De modo geral, as infecções causadas pelo fungo em pacientes imunocomprometidos é causada por *C. neoformans* var. *grubii* (MITCHELL; PERFECT, 1995; CASADEVALL; PERFECT, 1998), e naqueles hospedeiros imunocompetentes, a prevalência da ocorrência é de *C. gattii* (SORRELL, 2001, BICANIC; HARRISON, 2005). Na natureza, a variedade do fungo é encontrada em nichos ambientais diferentes. A variedade *grubii* e *neoformans* são frequentemente isoladas a partir de excretas de pombos e demais ambientes habitados por aves (LEVITZ, 1991). A variedade *gattii* está relacionada as árvores, principalmente do gênero *Eucalyptus* (ELLIS; PFEIFFER, 1990).

## 1.5 DIAGNÓSTICO

As leveduras do fungo *Cryptococcus* são facilmente visualizadas em microscópio. Amostras como liquor cefalorraquidiano, escarro e aspirado brônquico são de fácil visualização, devido a presença da cápsula polissacarídica do fungo, previamente corada com contraste negativo com tinta da China. Nesse caso, a cápsula do fungo isola e impede a penetração do corante na célula, permitindo a visualização da mesma, formando uma zona clara ao seu redor (ZERPA; HUICHO; GUILLEN, 1996). De formato esférico, as células se apresentam com ou sem brotamento ou com fibulas, medindo cerca de 5µm de diâmetro.

Outro ponto importante na sua patogenicidade é a capacidade de crescimento a 37°C, embora a temperatura ótima de crescimento da levedura seja entre 30 e 35°C. A presença de compostos difenólicos em meios de culturas diferenciados, como o ágar níger, facilitam a produção de fenoloxidase, importante composto na formação da melanina, evidenciada pela cor marrom nas colônias quando cultivados no meio de cultura (STEPANOVIC, et al., 2002). Assim, a manutenção da termotolerância pelas proteínas de choque térmico (HSP) são consideradas fatores que contribuem para a virulência, podendo-se destacar a HSP90, que está relacionada a capacidade de crescimento a

37°C (ROBERT; CASADEVALL, 2009; COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014; O'MEARA; COWEN, 2014).

A classificação de *Cryptococcus* por meio de reações colorimétricas é possível com a utilização do meio de cultura Canavanina-Glicina-Bromotimol (CGB) (KWON-CHUNG; POLACHEK; BENNETT, 1982). As espécies de *Cryptococcus* se diferenciam porque tem como princípio a resistência apresentada por *C. gattii* em meio de cultura contendo L-canavanina além da utilização da glicina como única fonte de carbono e nitrogênio, diferentemente de *C. neoformans* que tem o crescimento inibido nesse meio de cultura (HEITMAN et al., 2011).

O avanço da biologia molecular nos últimos tempos elevou o número de testes possíveis para a identificação precisa do fungo. Diversas técnicas foram desenvolvidas com base na análise do DNA, elucidando filogenia, caracterização e epidemiologia de *C. neoformans*. Dentre as mais comuns estão a eletroforese de campo pulsado, que demonstra polimorfismos de tamanho de cromossomos entre os isolados de *C. neoformans* (SPITZER et al., 1993; DROMER et al., 1994) e as análises de RFLP (SPITZER; SPITZER, 1994). Franzot et al. (1997) analisaram amostras isoladas do Brasil e de Nova York para verificar a diversidade destes isolados com a utilização do gene URA5 e concluíram que há uma dispersão global de isolados patogênicos.

Meyer et al. (1999), utilizando a técnica de PCR-*fingerprinting*, verificaram a existência de 8 grupos ou subtipos moleculares denominados: VNI (var. *grubii*, sorotipo A), VNII (var. *grubii*, sorotipo A), VNIII (sorotipo AD), VNIV (var. *neoformans*, sorotipo D), VGI, VGII, VGIII e VGIV (var. *gattii*, sorotipo B e C). Estudos posteriores revelaram a ausência de correlação entre os sorotipos B e C e os grupos moleculares de *C. gattii*.

*C. neoformans* apresenta distribuição geográfica mundial e sua presença tem sido associada a diferentes fontes ambientais, em especial, a presença de excrementos de aves e madeira em decomposição (KIDD et al. 2004). Diferentes estudos confirmaram a associação do fungo a excreta de aves, especialmente fezes de pombos, embora várias questões relacionadas a epidemiologia e ecologia de *C. neoformans* permanecem ainda pouco conhecidas (KOBAYASHI et al., 2005). No Brasil, estudo realizado no município de Goiânia, no estado de Goiás, mostrou que de um total de 290 amostras de fezes de pombos, solo, plantas ornamentais e material obtido de árvores de Eucalipto, *C. neoformans* var. *grubii* foi isolado em 36/177 (20,3%) das amostras de excretas de pombos e em 5/35 (14,3%) das amostras de Eucalipto (KOBAYASHI et al., 2005). Em outro estudo no município de Belém, a análise de 11 amostras ambientais



mostrou que duas foram positivas, sendo elas um oco de árvore (*Senna siamea*) colonizada simultaneamente por *C. gattii* – VGII e *C. neoformans* – VNI e uma gaiola de um aviário comercial colonizada por *C. neoformans* – VNI (COSTA et al., 2009).

No Brasil, há relatos de isolamento e infecção de *Cryptococcus* em quase todos os estados, tanto de amostras de origem ambiental quanto amostras clínicas. Sendo uma doença sistêmica grave causada pelo *C. neoformans* e *C. gattii*, a criptococose necessita de estudos epidemiológicos mais amplos e abrangentes (LAZERA et al., 1998). Excretas de aves são descritos como habitat natural destes patógenos, sendo os pombos os principais animais ligados a esta doença (BICANIC; HARRISON, 2005). Pombos, por migrarem para diversos lugares em busca de alimento e abrigo, disseminam o fungo por meio de seus bicos, penas e pernas, bem como apresentam colonização por este agente no papo (FILIÚ et al., 2002). Plantas, madeira em decomposição e oco de árvores são também considerados locais favoráveis a colonização do fungo como já mencionado anteriormente (FILIÚ et al., 2002).

Em Santa Catarina, poucos estudos foram realizados com relação a esse fungo, tanto em amostras clínicas quanto em amostras ambientais. Todos os estudos foram realizados em locais específicos ou nas mesmas cidades, sem traçar nenhum perfil epidemiológico a respeito das amostras encontradas em outras regiões. A investigação das características do fungo em uma região considerada pobre e de grande potencial de proliferação da levedura fortalece o objetivo do trabalho em evidenciar e classificar o fungo de acordo com os parâmetros conhecidos atualmente e fornecer dados suficientes para estudos posteriores.

Tendo em vista o exposto anteriormente, verifica-se a necessidade de avaliação da presença de espécies de *Cryptococcus* em excretas de pombos, tanto em áreas urbanas como rurais, bem como em áreas de florestamento da Serra Catarinense.

## 1.6 SERRA CATARINENSE

A Serra Catarinense é composta por dezoito municípios: Anita Garibaldi, Bocaina do Sul, Bom Jardim da Serra, Bom Retiro, Campo Belo do Sul, Capão Alto, Cerro Negro, Correia Pinto, Lages, Otacílio Costa, Painel, Palmeira, Ponte Alta, Rio Rufino, São Joaquim, São José do Cerrito, Urubici e Urupema (Figura 4).

Figura 4 – Mapa do Estado de Santa Catarina, evidenciando a Serra Catarinense.



Fonte: Adaptado de Santa Catarina Turismo (2016).

O clima predominante na região é o mesotérmico úmido, com temperaturas médias em torno de 16°C. Os climas subtropicais e temperados também são registrados na região, que apresenta inverno rigoroso e temperaturas abaixo de 0°C (IBGE, 2009).

A altitude média da Serra Catarinense é de 740 m acima do nível do mar, sendo a menor altitude encontrada no município de Anita Garibaldi com 716 m e a maior no município de São Joaquim com 1353m acima do nível do mar (IBGE, 2009). A colonização é predominantemente composta por alemães e italianos, com registro de menor número das etnias japonesa, polonesa, húngara, ucranianas e tcheca (FECAM, 2009).

Comparativamente aos outros estados brasileiros, Santa Catarina ocupa uma posição de destaque, sendo o Estado com o segundo melhor Índice de Desenvolvimento Humano (IDH). Contudo, considerando apenas o Estado, a Serra Catarinense possui o maior número de municípios com o IDH reduzido. Das cidades que constituem a região, somente Lages possui uma boa condição socioeconômica, que ocupa a 73ª posição estadual, e a cidade com o menor IDH é Cerro Negro, que ocupa a penúltima colocação estadual (PNUD, 2009).

Os municípios de Correia Pinto, Lages e Otacílio Costa dispõem de geografia favorável a produção de madeira em grande escala, tendo em seu território diversas indústrias de papel e celulose, além de amplo

comércio e beneficiamento de madeira, em especial, áreas de florestamento (SEBRAE, 2013). Assim, esses três municípios foram selecionados para coletas de amostras de folhas secas de Eucalipto para possível isolamento do fungo.

A região da Serra Catarinense é considerada pouco desenvolvida e a agricultura é de subsistência, sendo pequenos produtores na zona rural que dispõem de suas culturas para comércio na cidade grande (SEBRAE, 2013). Muitos não sabem ainda estocar adequadamente os produtos produzidos como o milho, o feijão, tomate, entre outros, fazendo com que aves dos mais diversos tipos, inclusive os pombos, se abriguem nos galpões e sobrevivam do resto que lhes sobra.

Nos maiores municípios, a população de pombos é grande, e estas aves habitam desde praças até residências, mas principalmente prédios públicos e demais construções da cidade que sofrem com a ação do tempo.

Os municípios que possuem menor população não sofrem com a infestação de pombos na área urbana, mas estas aves podem ser encontradas em quantidades consideráveis no interior do município, próximo ao produtor que estoca as suas culturas em galpões semiabertos e de fácil acesso a esses animais.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a variabilidade genotípica e fenotípica de espécies de *Cryptococcus* spp. Isolados de amostras ambientais da Serra Catarinense

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Isolar amostras de *Cryptococcus* a partir de diferentes amostras ambientais;

- Caracterizar as amostras isoladas utilizando parâmetros biológicos e bioquímicos;

- Verificar a presença de fatores de virulência dos isolados ambientais como a produção da urease, capacidade de crescimento a 37°C e produção de melanina;

- Caracterizar a variabilidade do gene CAP59 das amostras isoladas através de PCR-RFLP (Reação em Cadeia da Polimerase, associado com o Polimorfismo de Fragmentos de DNA obtidos por Enzimas de Restrição);

- Determinar os subgrupos genéticos das amostras isoladas através da análise da variabilidade genotípica dos minissatélites.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras utilizadas para o presente estudo foram de origem ambiental, sendo as fontes as excretas de pássaros e principalmente pombos da espécie *Columbia livia*, e folhas secas de árvores de eucalipto, ambas obtidas em municípios localizados na Serra Catarinense. Amostras de folhas Eucalipto e de excretas de aves foram coletadas separadamente, em frascos plásticos transparentes, identificados e estocados em ambiente abrigado da luz direta e calor.

A metodologia utilizada foi a descrita por Rezende et. al. (2008), com modificações. As áreas de reflorestamento das cidades de Correia Pinto, Otacílio Costa e Lages foram avaliadas por hectares. A cada quatro hectares, 10 amostras foram colhidas em diferentes pontos. A cada 45 árvores, uma amostra foi coletada contendo cerca de 10 gramas de folhas secas de eucalipto. Os frascos foram identificados, fechados e estocados em caixa de transporte.

Para as amostras provenientes de excretas de aves, a metodologia empregada foi aquela descrita por Casali et. al (2003) com modificações. As fezes de pombos foram coletadas em praças públicas, prédios e locais onde havia foco desses animais em todas as cidades estudadas. Com o auxílio de espátula, os locais que apresentavam as fezes dos animais em condições de coleta foram raspados. Após raspagem, o material obtido foi acondicionado em frascos secos, transparentes, com tampa, devidamente identificados com o local, temperatura ambiente e data. Nos locais com presença de excretas, foram coletadas cinco amostras aleatórias, contendo cerca de cinco gramas de material seco em cada uma e mantidas ao abrigo de calor e luz direta.

As coletas ocorreram entre os meses de abril de 2014 e março de 2016, respeitando as condições climáticas da época do ano e observando temperatura média entre as coletas. As coletas ocorreram a cada 90 dias, em todos os municípios, sendo respeitada uma carência de 14 dias sem chuva para que todo material potencialmente positivo pudesse secar e facilitar a coleta.

As amostras foram processadas no Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

## **3.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS OBTIDAS**

### **3.2.1 ISOLAMENTO DO FUNGO EM EXCRETAS DE AVES**

A metodologia utilizada para o processamento foi aquela descrita por Rezende et.al. (2008), com modificações. Um grama de cada amostra de excrementos provenientes das coletas realizadas foi pesado separadamente e transferido para um tubo de plástico de 50 mL contendo 10 mL de solução salina a 0,85%. Os tubos contendo a solução e a amostra foram agitados vigorosamente por cinco minutos em vortex e deixados em repouso por 30 minutos para a separação do sedimento espontaneamente. O sobrenadante foi coletado e semeado em meio de cultura Níger com cloranfenicol (0,2 g/L), incubado a 37°C por até 15 dias para isolamento do fungo.

### **3.2.2 ISOLAMENTO DO FUNGO EM AMOSTRAS DE FOLHAS**

A metodologia utilizada foi a mesma descrita no item 3.2.1, com modificações. Foram pesados cinco gramas de folhas secas provenientes das coletas realizadas nas cidades determinadas e estas amostras foram dispostas em tubos de plástico de 50 mL contendo 20 mL de solução salina a 0,85%. Os tubos foram agitados por cinco minutos em vórtex, posteriormente repousaram por 30 minutos para sedimentação espontânea. O sobrenadante foi coletado e semeado em ágar Níger contendo cloranfenicol (0,2 g/L) e incubado a 37°C por até 15 dias para desenvolvimento das colônias.

### **3.2.3 ESTOQUE E MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS**

As colônias que apresentaram cor marrom no ágar Níger foram repicadas em meio Sabouraud Dextrose Ágar (SDA) e incubadas a 30°C por 48 a 72 h para desenvolvimento de colônias. Posteriormente, as amostras foram submetidas a congelamento a -20°C contendo caldo Sabouraud Dextrose suplementado com 20% de glicerol. Repiques contínuos para manutenção dos isolados foram feitos e mantidos em geladeira (Silva et.al. 2008 - modificado).

### **3.2.4 DETERMINAÇÃO FENOTÍPICA**

### 3.2.4.1 VERIFICAÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA

#### 3.2.4.1.1 PRESENÇA DE CÁPSULA POLISSACARÍDICA

O teste para determinação da presença da cápsula polissacarídica do fungo se deu com teste direto com sistema lâmina-lamínula, onde uma gota de suspensão da cultura em solução salina adicionada a uma gota de tinta Nanquin foi examinada ao microscópio, em objetiva de 40x. A presença de leveduras encapsuladas foi determinada como presuntiva de *Cryptococcus* (LACAZ et. al., 2002).

#### 3.2.4.1.2 PRESENÇA DE UREASE

A pesquisa de urease ocorreu seguindo a metodologia descrita por COX et. al., (2000). Uma colônia foi repicada em meio de cultura de Christensen (0,1 g extrato de levedura, 91 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 95 mg  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 20 g uréia, 0,01 g vermelho de fenol, 1,5% de ágar em 1000 mL de água destilada, pH 7,0) e incubada em estufa microbiológica a temperatura de 30°C pelo período de 48 a 72 horas. Quando positivo, a indicação ocorre pela evidenciação da cor rosa no meio de cultura, devido a degradação da ureia em amônia que altera o pH para um estado mais alcalino. O resultado negativo é determinado quando não há mudança na cor do meio de cultura.

#### 3.2.4.1.3 CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE MELANINA

O protocolo para verificação da produção de melanina foi realizado conforme o descrito no item 3.2.1. Resumidamente, as amostras foram repicadas em placas contendo ágar níger (glicose 10 g, creatinina 780 mg, extrato de semente de *Guizottia abyssinica* (níger) 200 mL, ágar bacteriológico 20 g e 800 mL de água destilada) e após incubação por 48 horas a 28°C, foram avaliadas as colônias com coloração marrom, indicando a presença de melanina (SIDRIM, 1999 – modificado). Uma amostra controle (LMM799) proveniente do banco de amostras do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina foi usada como controle positivo.

### 3.2.5 QUIMIOTIPAGEM COM MEIO DE CULTURA

Uma classificação presuntiva entre as diferentes espécies de *Cryptococcus* é possível pela quimiotipagem utilizando o meio de cultura L-canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB) (100 mL de solução A: glicina 10 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g;  $\text{MgSO}_4$  1 g; sulfato de L-canavanina 30 mg em 1000 mL de água destilada; 20 mL de solução B: azul de bromotimol 0,4 g; NaOH 0,01N 64 mL em 36 mL de água destilada). O meio de cultura permite classificar previamente os isolados em *C. neoformans* e *C. gattii*. O surgimento de coloração azul no meio de cultura, após crescimento fúngico, indica metabolização da L-canavanina e utilização de glicina cujos produtos alcalinos alteraram o Ph do meio, identificando a espécie *gattii*. A identificação da espécie *neoformans* é dada pelo resultado inalterado da prova (KWON-CHUNG et al, 1982).

### 3.2.6 AMPLIFICAÇÃO DO GENE CAP59

Para amplificação, foi utilizada a metodologia descrita por Nakamura et al. (2000). As reações foram realizadas com volume final de 20 mL utilizando-se 1 U da enzima Taq DNA polimerase (Promega), 2 Mm de cada dNTP, 10 pmol de cada iniciador (CAP59F 5'-GAGTGTCTCGCGAACCCGCA-3' e CAP59R 5'-CCTACTCTGCCAAATCAACTC-3') e 10 ng/mL de cultura em um tampão contendo 10 Mm Tris-HCl pH 8,3, 50 Mm KCl, 1,5 Mm  $\text{MgCl}_2$  sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguida de 35 ciclos a 94°C por 1 min, ligação do iniciador a 60°C por 2 min, extensão a 72°C por 3 min. O produto amplificado foi resolvido em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo, visualizado em transiluminador e fotodocumentado digitalmente.

### 3.2.7 PURIFICAÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO DO FRAGMENTO DO GENE CAP59

Quinze microlitros do amplicon de 597pb foi precipitado com 40  $\mu\text{L}$  de isopropanol 70% centrifugado a 13000 g/ 45 min e lavado com etanol 70%. A seguir o DNA foi suspenso em 13  $\mu\text{L}$  de água ultrapura estéril e 3  $\mu\text{L}$  da solução foi submetida a eletroforese em gel de agarose conforme item 3.2.6.

### 3.2.8 TIPAGEM MOLECULAR DAS AMOSTRAS POR PCR-RFLP

Cinco  $\mu\text{L}$  do produto amplificado de 597pb foi digerido a 37°C por 3 h com 1U das enzimas de restrição *AvaII* e *HaeIII* em um volume final de 10  $\mu\text{L}$ . Cinco  $\mu\text{L}$  do produto digerido foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e corados com brometo de etídeo, visualizados em transiluminador e fotodocumentados. Amostra do sorotipo A (ATCC-LMM794), sorotipo B (ATCC-LMM799), sorotipo C (ATCC-LMM801), sorotipo D (ATCC-LMM797) e sorotipo AD (ATCC-LMM796), provenientes do banco de amostras do Laboratório de Protozoologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina foram utilizadas como controle.

### 3.2.9 DETERMINAÇÃO DOS SUBGRUPOS POR PCR-FINGERPRINTING

A amplificação ocorreu segundo Meyer et. al. (1999). As amostras foram preparadas em volume final de 20  $\mu\text{L}$  utilizando 2,5 U da enzima Taq DNA polimerase (GreenTaq – Promega), 0,2 Mm de cada dNTP, 10 pmol do iniciador M13 (5'- GAGGGTGGCGTTCT 3') e 10 ng/ $\mu\text{L}$  de cultura, contendo tampão 10 Mm Tris-HCl (pH 8,3), 50 Mm KCl, 1,5 Mm  $\text{MgCl}_2$ . Para amplificação, as amostras foram submetidas a desnaturação a 94°C por 20 s, seguido de 35 ciclos a 94°C por 20 s, ligação do iniciador a 50°C por 1 min, extensão a 72°C por 20 s e extensão final a 72°C por 6 min. Cinco  $\mu\text{L}$  do produto amplificado foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida 6% como descrito no item 3.2.8.

Amostras referência 0055 (VNI), 0056 (VNII), 0057 (VNIII), 0058 (VNIV), 0059 (VGI), 0060 (VGII), 0061 (VGIII) e 0062 (VGIV), foram obtidas do Laboratório de Micologia – INI/FIOCRUZ Coleção de Fungos Patogênicos (CFP) da Fundação Oswaldo Cruz.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 COLETA DE AMOSTRAS

Cinco amostras de excretas de aves foram coletadas em cada município da região serrana, durante 8 coletas, totalizando 720 amostras. Dez amostras de folhas secas de eucalipto foram coletadas em cada



fazenda de florestamento, também realizada em 8 coletas nos municípios propostos no estudo, totalizando 240 amostras (Tabela 1).

O crescimento de colônias ocorreu em 677 (94,02%) das amostras provenientes de excreta de pombos (placas), sendo identificado *Cryptococcus* em 17 amostras (2,51%), todas provenientes do município de Lages. As amostras foram nomeadas como LA1, LA2, LA3, LA4, LA5, LA6, LA7, LA8, LA9, LA10, LA11, LA12, LA13, LA14, LA15, LA16 e LA17. Nas demais placas em que houve crescimento, não foi observado a morfologia colonial compatível com *Cryptococcus* de acordo com os critérios propostos por Lacaz et. al. (2002).

Para as amostras provenientes de folhas de eucalipto, o crescimento de colônias ocorreu em 216 amostras (90%), não sendo identificadas colônias sugestivas de *Cryptococcus* em nenhuma placa.

Tabela 1- Amostras ambientais (excreta de pombos e folhas de Eucalipto) coletadas em diferentes municípios no período de Abril de 2014 a Março de 2016 submetidas a cultura para isolamento de *Cryptococcus* spp.

| Município           | Número de coletas | Amostras totais | Excretas de Pombos | Folhas de Eucalipto | Positivas Confirmadas |
|---------------------|-------------------|-----------------|--------------------|---------------------|-----------------------|
| Anita Garibaldi     | 8                 | 40              | 40                 | 0                   | 0                     |
| Bocaina do Sul      | 8                 | 40              | 40                 | 0                   | 0                     |
| Bom Jardim da Serra | 8                 | 40              | 40                 | 0                   | 0                     |
| Bom Retiro          | 8                 | 40              | 40                 | 0                   | 0                     |
| Campo Belo do Sul   | 8                 | 40              | 40                 | 0                   | 0                     |
| Capão Alto          | 8                 | 40              | 40                 | 0                   | 0                     |
| Cerro Negro         | 8                 | 40              | 40                 | 0                   | 0                     |
| Correia Pinto       | 8                 | 120             | 40                 | 80                  | 0                     |
| Lages               | 8                 | 120             | 40                 | 80                  | 17                    |
| Otacílio Costa      | 8                 | 120             | 40                 | 80                  | 0                     |

|            |   |    |    |   |   |
|------------|---|----|----|---|---|
| Painel     | 8 | 40 | 40 | 0 | 0 |
| Palmeira   | 8 | 40 | 40 | 0 | 0 |
| Ponte      | 8 | 40 | 40 | 0 | 0 |
| Alta       |   |    |    |   |   |
| Rio        | 8 | 40 | 40 | 0 | 0 |
| Ruíno      |   |    |    |   |   |
| São        | 8 | 40 | 40 | 0 | 0 |
| Joaquim    |   |    |    |   |   |
| São José   | 8 | 40 | 40 | 0 | 0 |
| do Cerrito |   |    |    |   |   |
| Urubici    | 8 | 40 | 40 | 0 | 0 |
| Urupema    | 8 | 40 | 40 | 0 | 0 |

#### 4.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DOS ISOLADOS: PRESENÇA DE CÁPSULA, PRODUÇÃO DE MELANINA E CRESCIMENTO A 37°C

Todos os 17 isolados eram de leveduras globosas, pouco encapsuladas, produtoras de melanina quando cultivada em ágar Níger como descrito no item 3.2.1, e termotolerantes a 37°C. Todos os isolados foram submetidos a visualização no sistema lâmina-lamínula para verificação da cápsula com a coloração com tinta Nanquin e observação em microscópio óptico em objetiva de 40x, como descrito no item 3.2.4.1.1 (Tabela 2). As amostras apresentaram diferenças marcantes quanto ao tamanho da cápsula conforme mostrado na Figura 5.

Figura 5 – Foto representativa das diferenças no tamanho da cápsula polissacarídica do fungo. Ao lado esquerdo, observa-se fungos com cápsula delgada, enquanto a foto à direita evidencia uma cápsula espessa. Barra 10µm.

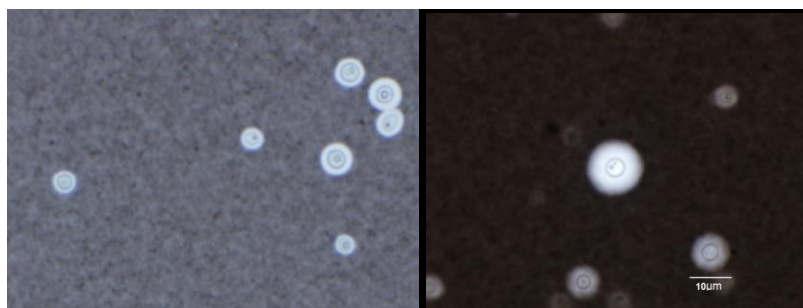


Tabela 2– Caracterização morfológica e bioquímica de amostras de *Cryptococcus* isoladas.

| Amostra | Crescimento<br>a 37°C | Produção<br>de<br>melanina | Presença<br>de Cápsula | Urease | Quimiotipagem |
|---------|-----------------------|----------------------------|------------------------|--------|---------------|
| LA1     | P                     | P                          | P                      | P      | I             |
| LA2     | P                     | P                          | P                      | P      | I             |
| LA3     | P                     | P                          | P                      | P      | I             |
| LA4     | P                     | P                          | P                      | P      | I             |
| LA5     | P                     | P                          | P                      | P      | I             |
| LA6     | P                     | P                          | P                      | P      | I             |
| LA7     | P                     | P                          | P                      | P      | I             |
| LA8     | P                     | P                          | P                      | P      | I             |
| LA9     | P                     | P                          | P                      | P      | I             |
| LA10    | P                     | P                          | P                      | P      | I             |
| LA11    | P                     | P                          | P                      | P      | I             |
| LA12    | P                     | P                          | P                      | P      | I             |
| LA13    | P                     | P                          | P                      | P      | I             |
| LA14    | P                     | P                          | P                      | P      | I             |
| LA15    | P                     | P                          | P                      | P      | I             |
| LA16    | P                     | P                          | P                      | P      | I             |
| LA17    | P                     | P                          | P                      | P      | I             |

Legenda: P – Positivo N – Negativo I - Inalterado

#### 4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS QUANTO A PRODUÇÃO DE UREASE

A metodologia empregada como descrito no item 3.2.4.1.2 permitiu verificar a produção de urease nos 17 isolados obtidos. Todos os isolados foram testados e submetidos ao teste de quimiotipagem como descrito no item 3.2.5.

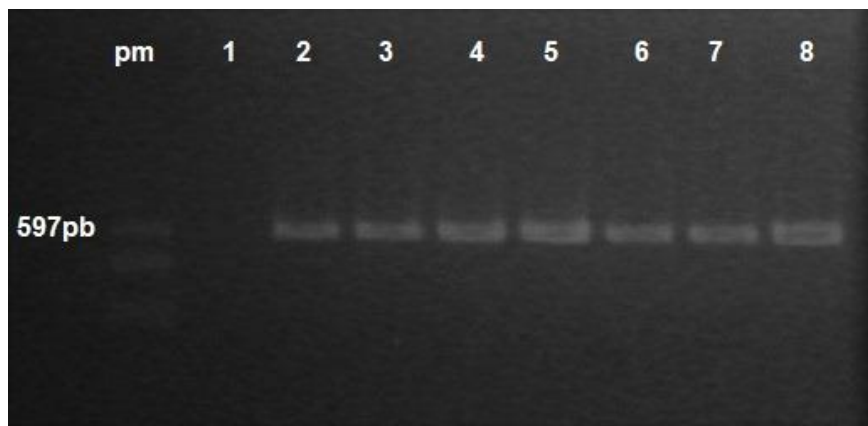
#### 4.4 QUIMIOTIPAGEM EM MEIO DE CULTURA

A utilização do meio de cultura CGB descrito no item 3.2.5 foi realizada para identificação presuntiva do fungo para sua diferenciação entre *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. Os 17 isolados não alteraram o meio, classificando-os presuntivamente como *Cryptococcus neoformans* (Tabela 2).

#### 4.5 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS POR PCR

As amostras isoladas foram submetidas a reação de PCR para amplificação do gene CAP59 a partir de leveduras obtidas diretamente de cultura sem prévia extração de DNA como descrito no item 3.2.6. O tamanho do fragmento esperado de 597pb foi observado para todos os isolados.

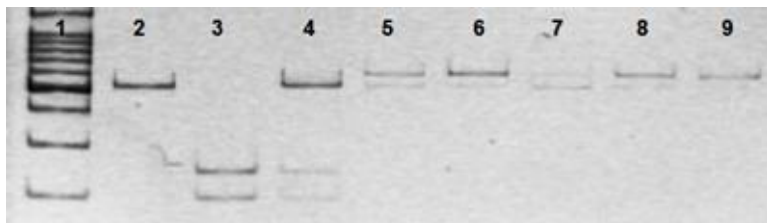
Figura 6– Gel de agarose 1,5% corado pelo brometo de etídeo representativo da amplificação do gene CAP59 de amostras ambientais de *Cryptococcus neoformans* isolados de excreta de pombos do município de Lages. PM = DNA de PUC18 clivado com a endonuclease *Hae*III; 1- Controle negativo (sem adição de DNA); 2- Controle positivo cepa LMM794; 3 a 8 – Amostras isoladas.



#### 4.6 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS POR PCR-RFLP

A digestão do produto de amplificação de 597pb com as enzimas de restrição *Ava*II e *Hae*III mostrou que todas as amostras isoladas pertencem ao sorotipo A, uma vez que em nenhuma delas ocorreu a clivagem do produto amplificado de 597pb.

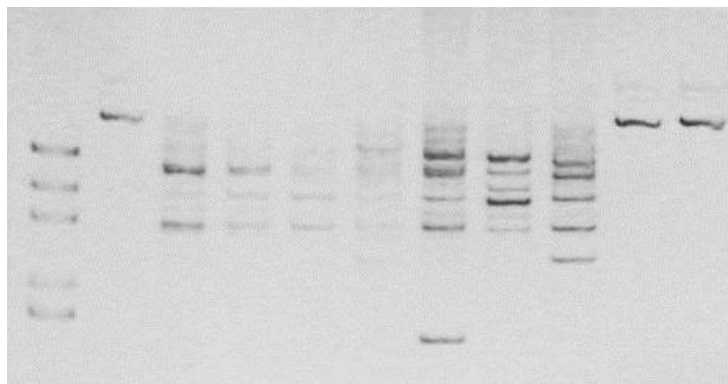
Figura 7– Gel de poliacrilamida 6% corado pelo brometo de etídeo representativo da digestão do fragmento amplificado de 597 pb do gene CAP59 pelas endonucleases de restrição *Ava*II e *Hae*III. 1 – 100pb Ladder; 2 – Sorotipo A. 3 – Sorotipo D. 4 – Sorotipo AD. 5 a 9 – Amostras Isoladas.



#### 4.7 FINGERPRINTING

O iniciador M13 foi utilizado para amplificação de regiões repetitivas de 51inissatélites das amostras padrões (VN1-VNIV e VGI-VGIV) e para as 17 amostras ambientais de *C. neoformans* isoladas a partir de excretas de aves. A análise dos resultados mostrou que as 17 amostras apresentaram um padrão de bandas idêntico ao padrão VNI.

Figura 8 – Gel poliacrilamida 6% corado pelo brometo de etídeo representativo do perfil de PCR-fingerprinting obtido com iniciador M13 das amostras padrão e de amostras isoladas de *Cryptococcus neoformans*. 1 – DNA de PUC18 clivado com a endonuclease *HaeIII*; 2 – VNI; 3 – VNII; 4 – VNIII; 5 – VNIV; 6 – VGI; 7 – VGII; 8 – VGIII; 9 – VGIV; 10 e 11 – Amostras Isoladas.





## 5 DISCUSSÃO

As espécies de *Cryptococcus* causadoras de criptococose são a segunda maior causa de infecções fúngicas oportunistas, ficando atrás somente das infecções por fungos do gênero *Candida* spp. A ocorrência deste tipo infecção em países desenvolvidos é baixa comparando aos casos relatados em países em desenvolvimento (MEYER, TRILLES, 2010). Neste trabalho, não levamos em consideração os casos de criptococose na região serrana, nem mesmo os dados epidemiológicos foram buscados. O foco deste trabalho foi o isolamento de amostras ambientais e a caracterização molecular dos isolados para evidenciar a prevalência da espécie na região.

Embora tenham distribuição cosmopolita, as espécies de *C. neoformans* apresentam diferenças ecológicas e epidemiológicas, sendo isolado de diferentes fontes ambientais, principalmente excretas de aves (ABEGG et al., 2006). O gênero *C. gattii* também é considerado cosmopolita, entretanto, este é associado mais frequentemente a matéria orgânica em decomposição, como por exemplo folhas secas de árvores e madeira em decomposição (ROMEO et al., 2012; KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; LAZERA et al., 1998).

No presente estudo utilizamos excretas de aves e amostras de folhas de Eucalipto de municípios da Serra Catarinense para o isolamento do fungo. Das 720 amostras de excreta de aves examinadas 2,51% foram positivas para *Cryptococcus*, todas provenientes do município de Lages. Estas amostras foram coletadas em abrigos de pombos e locais onde há microfocos dos animais, como por exemplo, praças públicas.

Estudos anteriores de isolamento de *Cryptococcus* em praças públicas de Lages realizados por Scain et. al. (2011) e Menezes et. al. (2014) mostraram que a Praça Santa Cruz é o local de maior incidência de pombos e também o local onde o maior número de isolamentos do fungo foi realizado. No presente estudo, dez das dezessete amostras positivas obtidas foram desta praça, indicando um habitat favorável para o desenvolvimento do fungo, sugerindo uma distribuição focal. Nos demais municípios avaliados, apesar do número considerável de amostras de excretas coletadas, em nenhuma delas foi possível isolar fungos do gênero *Cryptococcus*.

No Brasil, a distribuição destes fungos é bastante variada, porém evidenciada e confirmada por diferentes estudos. Na região Norte e Nordeste, a frequência de *C. gattii* é maior que em outras regiões do país (CORRÊA et al., 1999; DARZÉ et al., 2000; SANTOS et al., 2008). De

maneira geral, a espécie *C. neoformans* ainda é a mais encontrada nos estados brasileiros (LEAL et al., 2008; LINDENBERG et al., 2008; MOREIRA et al., 2006).

As regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste apresentam prevalência do sorotipo A, confirmando os resultados obtidos nesse trabalho. Nas demais regiões, os sorotipos mais encontrados são o B e C, como confirma o estudo de Nishikawa et al. (2003).

Durante décadas, as sugestões de que a espécie *C. gattii* era restrita às regiões de clima tropical foram aceitas. No entanto, com o surto de criptococose no Canadá e nos Estados Unidos, somado aos isolados de amostras clínicas e ambientais de regiões de clima temperado revelou-se o potencial de expansão e o domínio geográfico desse fungo (ROMEO et al., 2012; COGLIATI, 2013).

Os resultados obtidos nesse trabalho para isolamento de *Cryptococcus* a partir de folhas secas de árvores corroboram com os resultados encontrados no estudo de Yamamura et al. (2013). Em contrapartida, difere dos resultados obtidos por Lázera et al. (2000), cujo isolamento de 32 amostras obtidas de ocos de árvores e folhas secas resultaram no isolamento de 123 colônias de *C. neoformans* e *C. gattii*.

Mazza et al. (2013), isolaram a variedade *C. gattii* e *C. neoformans* de diferentes espécies de árvores afirmando que além dos eucaliptos australianos, árvores nativas e exóticas são potenciais fontes de isolamento de *C. gattii*.

Cogliati (2013) acredita que o baixo índice de amostras positivas se deve ao fato do rápido crescimento de fungos filamentosos contaminantes que interferem no crescimento da levedura e consequentemente, resulta em isolado falso negativo. Neste trabalho, o baixo índice de amostras positivas se deve a diversos fatores, mais especificamente a um prolongado período de chuvas em que as coletas foram completamente paralisadas em função das condições climáticas. Contudo, o não isolamento de amostras a partir de material vegetal sugere que na região a prevalência do fungo possivelmente seja mais baixa que a observada em outras regiões do país, ou que as condições climáticas tenham afetado negativamente o seu isolamento a partir de amostras ambientais. O não isolamento do fungo em amostras de excretas coletadas em outros municípios, mesmo em propriedades do interior onde devido a estocagem de grãos há uma maior concentração de pombos, reforça a hipótese de que a distribuição pode ser focal e que diferenças no microambiente podem influenciar a presença ou não do fungo.

Passoni et al. (1999) afirmam que o resultado de cultura negativo não elimina a chance do fungo estar presente no ambiente, sendo



necessárias novas coletas nos mesmos locais em diferentes situações, como ocorreu neste trabalho. Embora as coletas tenham ocorrido em intervalos de 90 dias, respeitando um intervalo de pelo menos 14 dias sem chuva, em nenhum dos municípios a exceção de Lages obtivemos amostras positivas para *Cryptococcus*.

No presente estudo, a variação de temperatura nas datas de coleta foi de 7 a 30°C. É importante ressaltar que durante o período de coletas, a região serrana foi afetada por chuvas intensas, o que pode ter impactado negativamente na obtenção de amostras adequadas (fezes secas) e consequentemente, no isolamento do fungo. A análise macroscópica das colônias durante o processo de isolamento mostrou ausência da morfologia colonial compatível, o que foi também corroborado pela análise microscópica das colônias e das estruturas morfológicas, como a presença de cápsula e brotamento. É importante ressaltar que em apenas cinco maiores municípios (Lages, Otacilio Costa, Urubici, São Joaquim e Correia Pinto), populações de pombos com mais de 50 indivíduos estavam presentes em praças, igrejas, escola e prédios públicos. Em mais de 50% das placas observamos o crescimento do fungo *Rhodotorula* spp. E em todas as 17 placas onde isolamos *Cryptococcus* também havia o crescimento de *Rhodotorula*, sugerindo que seu crescimento não inibe o crescimento de *Cryptococcus*. Estes resultados sugerem que a distribuição de *Cryptococcus* parece não ser homogênea, visto que no prédio da garagem da prefeitura do município de São Joaquim onde há uma grande população de pombos e a presença de fezes secas em grande quantidade, não foi possível isolar *Cryptococcus* em nenhuma das 8 tentativas. O fungo é capaz de se adaptar a um gradiente amplo de temperaturas (-10°C a 37°C), como no Canadá (FRANZOT et al., 1999; GALANIS et al., 2010). Na Serra Catarinense a variação de temperatura no período de estudo oscilou entre 7°C no inverno e 30°C no verão.

Kwon-Chung e Rhodes (1986), estudaram a produção de melanina e afirmaram que este é um fator de virulência para leveduras de *C. neoformans* e *C. gattii*, que está diretamente ligada ao mecanismo de defesa do fungo dificultando sua fagocitose por células do sistema imunológico do hospedeiro. A produção de melanina é, portanto, utilizada como critério bioquímico para identificação de *Cryptococcus*. No presente estudo, todas as amostras isoladas foram capazes de produzir melanina em meio níger, desenvolvendo colônias de pigmento escuro em tons amarronzados devido a atividade da fenoloxidase.

Baseado em dados de sorotipagem, a espécie *C. neoformans* variedade *neoformans* era classificada em duas subdivisões, os sorotipos A e D. No entanto, Franzot et. al. (1999) utilizando diferentes técnicas de

biologia molecular e dados epidemiológicos, imunológicos e genéticos propuseram a separação destes dois sorotipos em duas variedades: sorotipo A (*C. neoformans* var. *grubii*) e sorotipo D (*C. neoformans* var. *neoformans*). A separação e diferenciação entre estas variedades é revelada em diversos estudos, mostrando que a distribuição dos sorotipos ao redor do planeta, onde o sorotipo A é ubíquo e prevalente em todos os continentes, é o principal agente etiológico de criptococose em humanos. O sorotipo D foi relatado frequentemente no passado em diversos países da Europa, Oceania, Ásia e Estados Unidos (COGLIATI, 2013; TSENG et al., 2013).

Embora os primeiros parâmetros para classificação do fungo em sorotipos tenham sido feitos com anticorpos em testes de aglutinação, a interrupção na produção do kit comercial Cripto Check® pela empresa japonesa IATRON Laboratories Inc. forçou os pesquisadores a desenvolverem técnicas alternativas de biologia molecular para identificação e classificação dos isolados. Latouche et. al. (2003) desenvolveram um protocolo através da amplificação do gene da fosfolipase B (PLB1), seguido de clivagem com as enzimas de restrição *Ava*I e *Hind*III, permitindo a classificação dos sorotipos A, D e AD. Dambrós et al (2005), desenvolveram uma metodologia para diferenciação dos cinco sorotipos baseado em PCR-RFLP do gene CAP59 e clivagem do produto amplificado com as endonucleases de restrição *Ava* II e *Hae* III (PI-0602571-4<sup>a</sup>). Ito-Kuwa et. al. (2007), desenvolveram uma PCR-multiplex, utilizando com alvos o gene de lacase e CAP59, diferenciando todos os sorotipos.

Morrow et. al. (2012) estudaram o sorotipo A e evidenciaram uma alteração da arquitetura genômica que compreende uma duplicação e seis inversões que afetam dois genes em particular, dos quais um deles codifica uma nova proteína no metabolismo da glicose na temperatura corporal humana e o segundo codifica um fator de transcrição modulador de melanina. Essa mutação nestes dois genes favorece a habilidade do fungo de crescer a 37°C, o que poderia explicar a maior prevalência e patogenicidade deste sorotipo, levando em consideração sua distribuição mundial.

Dambrós (2005) caracterizando 35 amostras de *C. neoformans* isoladas de pacientes verificou que todas pertenciam ao tipo A (var. *grubii*) de acordo com a técnica de PCR-RFLP e que a genotipagem por PCR-fingerprinting mostrou um padrão molecular VNI em 34 das 35 amostras. Carvalho et. al. (2007) estudando oito amostras de *Cryptococcus* isoladas a partir de amostras ambientais em Minas Gerais, concluíram que todos pertenciam ao sorotipo A. No mesmo estado,

Moreira et. al. (2006) estudaram 96 isolados clínicos e determinaram um percentual de 92,7% dos isolados como pertencentes ao sorotipo D e apenas 7,3% aos sorotipos B e C.

Casali et. al. (2003) estudando 124 isolados clínicos e ambientais no estado do Rio Grande do Sul, utilizando o kit *Cripto Check* verificaram que 84% das amostras foram tipadas como pertencentes ao sorotipo A, 9% ao sorotipo B e 7% do sorotipo D. Liaw et. al. (2009), estudando amostras de Taiwan, comprovaram que de oito isolados ambientais, apenas um pertencia ao sorotipo B, sendo o restante pertencente ao sorotipo A. Romeo et. al. (2012), estudando 123 isolados ambientais da Itália verificaram que 99,2% foram identificados como do sorotipo A e apenas 0,8% do sorotipo B. Os resultados obtidos neste trabalho concordam e reforçam os dados publicados por Trilles et. al. (2008) onde foi constatado que no Brasil o sorotipo A representa cerca de 70% das infecções, seguida pela variedade *gattii* (sorotipos B/C), com 28%. O sorotipo D que não foi encontrado neste trabalho, corresponde a cerca de 3% das infecções.

Nesse estudo, utilizando a metodologia de PCR-RFLP, 100% das amostras isoladas foram classificadas como *C. neoformans* var. *grubii*. Sorotipo A. Estudo anterior realizado com 35 amostras isoladas de pacientes portadores de criptococose mostrou que todas as amostras foram identificadas como *C. neoformans* var. *grubii*. Sorotipo A (DAMBRÓS, 2005).

Diferentes marcadores moleculares são utilizados com sucesso para o estudo da variabilidade genética de organismos. Meyer et. al. (2003) estabeleceram uma rede de pesquisa para caracterização da variabilidade genética de *C. neoformans* em países Ibero Americanos, incluindo a Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, México, Peru, Venezuela, Guatemala e Espanha, utilizando a técnica de PCR-fingerprinting com o iniciador M13 dirigido para regiões repetitivas de DNA (micro e minissatélites) e PCR-RFLP do gene URA5 digerido com as enzimas *HhaI* e *Sau96I*. Os resultados da análise de 340 amostras clínicas e ambientais mostrou que 68,2% dos isolados (n=232) foram agrupados no genótipo VNI (var. *grubii*, sorotipo A) o que está de acordo os dados de infecção criptocócica mundial em humanos, seguida de 5,6% (n= 19) padrão molecular VNII (var. *grubii*, sorotipo A), 4,1% (n= 14) genótipo VNIII (sorotipo AD , híbrido), 1,8% (n= 6) padrão molecular VNIV (var. *neoformans*, sorotipo D), 3,5% (n=12) VGI, 6,2% (n=21) VGII, 9,1% (n=31) VGIII e 1,5% (n=5) VGIV todos da variedade *gattii* sorotipos B e C.

Das amostras provenientes do Brasil, 57 foram oriundas dos estados de São Paulo, Piauí e Rio Grande do Sul. As 39 amostras provenientes de pacientes com AIDS do estado de São Paulo mostraram uma predominância do padrão molecular VNI (n=36), seguido de VGII (n=2), VNII (n=1) (Meyer et. al. 2003). De seis amostras do estado do Piauí, uma amostra isolada de paciente HIV positivo apresentou padrão molecular VGII e as demais foram VNI (n=3) e VGII (n=2). Casali et al. (2003), caracterizando amostras de *Cryptococcus* do estado do Rio Grande do Sul, verificaram que das 124 amostras clínicas de *C. neoformans*, 83,8% apresentaram padrão molecular VNI (var. *grubii*), 8,87% VGIII (var. *gatti*) e 7,26% VNIV (var. *neoformans*). Esses resultados mostraram que no Brasil ocorrem sete genótipos (VNI, VNII) var. *grubii*, (VNIII) híbrido AD, (VNIV) var. *neoformans* e (VGI, VGII e VGIII) var. *gatti* de *C. neoformans*.

Trilles et. al. (2008) caracterizando amostras de onze estados brasileiros, verificaram que o genótipo VNI foi observado em 64,0% das amostras e VGII em 21%.

Kidd et al. (2004) caracterizando amostras de *Cryptococcus* verificaram que o genótipo VGII foi o mais prevalente isolado a partir de fontes ambientais no Canadá e na região noroeste dos Estados Unidos. Da mesma forma, na América Central, Loperena-Alvarez et al. (2010) coletaram amostras ambientais em Porto Rico e observaram a prevalência do genótipo VGII. Costa et al. (2009) observaram a prevalência do genótipo VGII na região Norte do Brasil em amostras de origem ambiental. As divergências entre genótipos nas diferentes regiões do Brasil ressaltam que esta classificação pode divergir de uma região para outra e que requer mais estudos principalmente de amostras ambientais para que se tenha um panorama mais amplo dos genótipos existentes (LUGARINI et al., 2008; TRILLES et al., 2008).

Em um estudo realizado por Meyer et. al. (2003) na América Latina, foi evidenciada a presença de *C. neoformans* como a espécie mais prevalente.

Ainda existem poucos trabalhos a respeito da tipagem molecular de *C. neoformans* a partir de amostras ambientais. A região serrana de Santa Catarina é um polo a ser explorado, tendo em vista a capacidade de produção madeireira e a rápida expansão das áreas de florestamento. Dados nacionais de caracterização genotípica de *Cryptococcus* de amostras ambientais são escassos (ANDRADE-SILVA et al., 2010; SOUZA et al., 2010).

## 6 CONCLUSÃO

O isolamento de *Cryptococcus* a partir de excrementos de pombos foi possível em apenas um município dentre os dezoito estudados na região Serrana de Santa Catarina, mostrando então, por meio dos testes bioquímicos, a presença da espécie *Cryptococcus* na Serra Catarinense.

A reação de PCR-RFLP do gene CAP59 revelou que todas as amostras isoladas foram agrupadas no sorotipo A, indicando a prevalência deste sorotipo na região estudada. Já a classificação dos subgrupos através da técnica de PCR-fingerprinting utilizando o iniciador M13 revelou que todas as amostras pertencem ao padrão molecular VNI.

Este estudo foi importante na elucidação da distribuição dos fungos *Cryptococcus* na região em questão, indicando que não há homogeneidade na presença destes, apresentando focos em apenas uma das cidades estudadas.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEGG, M. A.; CELLA, F. L.; FAGANELLO, J.; VALENTE, P.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of psittaciformes in a southern Brazilian zoological garden. **Mycopathologia**, v. 161, p.83-91, 2006.

AKSENOV, S. I.; BABYEVA, I. P.; GOLUBEV, V. I. On the mechanism of adaptation of micro-organisms to conditions of extreme low humidity. **Life. Science Space Research**, v.11, p.55-61. 1973.

ALSPAUGH, J. A.; DAVIDSON, R. C.; HEITMAN, J. Morphogenesis of *Cryptococcus neoformans*. **Contribuition Microbiology**, v. 5, p. 217-238. 2000.

ANDRADE-SILVA, L.; FERREIRA-PAIM, K.; SILVA-VERGARA, M. L.; PEDROSA, A. L.; Molecular characterization and evaluation of virulence factors of *Cryptococcus laurentii* and *Cryptococcus neoformans* strains isolated from external hospital areas. **Fungal Biology**, v.114, p. 438-445, 2010.

BARNETT, J. A. A history of research on yeasts 14: medical yeast part 2, *Cryptococcus neoformans*. **Yeast**, v. 27, p. 875-904, 2010.

BICANIC, T.; HARRINSON, T. S. Cryptococcal meningitis. **British Medical Bulletin**, V.72, n.1, p. 99-118, 2005.

BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censos**. Disponível em [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br). Acesso em 15/06/2016

BUTLER, M. J.; DAY, A. W. Fungal Melanins: a review. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44, p.1115-136, 1998.

CARVALHO, V. G.; TERCETI, M. S.; DIAS, A. L. T.; PAULA, C. R.; LYON, J. P.; SIQUEIRA, A. M.; FRANCO, M. C. Serotype and mating type characterization of *Cryptococcus neoformans* by multiplex PCR. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 4, p. 207-210, 2007

CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*. Washington, DC: **American Society for Microbiology Press**, 1998. 541p.

CASALI A. K.; GOULART, L.; ROSA, E.; SILVA, L. K.; RIBEIRO, A. M.; AMARAL, A.; ALVES, S. H.; SCHRANK, A.; MEYER, W.; VAINSTEIN, M. H. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. **FEMS Yeast Research**, v.3, n.4, p.405-415. 2003.

CDC – Center for Disease control and Prevention. **Cryptococcosis**, Disponível em: <http://www.cdc.gov>. Acesso em 18 de maio de 2016.

CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. **Molecular Cell Biology**, v.14, p. 4912-4919, 1994

CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. Isolation of the third capsule-associated gene, CAP60, required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Infection Immunology**, v.66, p.223-236, 1998.

CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. Isolation, Characterization and localization of a Capsule-associated gene, CAP10, of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Bacteriology**, v.181, p. 5636-643. 1999.

CHANG, Y. C.; PENOYER, L. A.; KWON-CHUNG, K. J. The second capsule gene of *Cryptococcus neoformans*, CAP64, is essential for virulence. **Infection Immunology**, v. 64, n.6, p.1977-1983. 1996.

CHANG, Y. C.; WICKES, B. L.; MILLER, G. F.; PENOYER, L. A.; KWON-CHUNG, K. J. *Cryptococcus neoformans* STE12alpha regulates virulence but is not essential for mating. **Journal of Experimental Medicine**, v.191, p. 871-882, 2000.

CHEE, H. Y.; LEE, B. K. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. grubii (serotype A) from pigeon dropping in Seoul, Korea. **Journal Microbiology**, v. 43, p. 469-472, 2005.

CHEN, S.; SORRELL, T.; NIMMO, G.; SPEED, B.; CURRIE, B.; ELLIS, D.; MARRIOTT, C; PFEIFFER, T.; PARR, D.; BYTH, K. Epidemiology, and host and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, p. 499-508, 2000.

CHERNIAK, R; O'NEILL, E. B.; SHENG, S. Assimilation of xylose, mannose, and mannitol for synthesis of glucuronoxylomannan of *Cryptococcus neoformans* determined by <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Infection Immunity**, v.66, n.6, p. 2996-2998, 1998.

COELHO, C.; BOCCA, A. L.; CASADEVALL A. The intracellular life of *Cryptococcus neoformans*. **Annual Review of Pathology**, v. 9, p. 219-138, 2014.

COGLIATI, M. Global molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: an atlas of the molecular types. **Scientifica**, v. 2013, p. 1-23, 2013.

CORRÊA, M. P.; OLIVEIRA, E. C.; DUARTE, R. R.; PARDAL, P. P.; OLIVEIRA, F. M.; SEVERO, L. C. Cryptococcosis in children in the State of Para, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, p. 505-508, 1999.

COSTA, S. P. S. E.; LAZERA, M. S; MORALES, B. P.; BEZERRA, C. C. F.; NISHIKAWA, M.; BARBOSA, G. G.; TRILLES, L.;

NASCIMENTO, J. L. M.; WANKE, B. First isolation *Cryptococcus gattii* molecular type VGII and *Cryptococcus neoformans* type VNI from environmental sources in the Belem City, Para, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 662-664, 2009.

COX, G. M.; MCDADE, H. C.; CHEN, S. C.; TUCKER, S. C.; GOTTFREDSSON, M.; WRIGHT, L. C.; SORRELL, T. C.; LEIDICH, S. D.; CASADEVALL, A.; GHANNOUM, characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. Australasian Cryptococcal Study Group. **Clinical Infection Disease**, v.31, n.2, p.499-508, 2000.

COX, G. M.; MCDADE, H. C.; CHEN, S. C.; TUCKER, S. C.; GOTTFREDSSON, M.; WRIGHT, L. C.; SORRELL, T. C.; LEIDICH, S. D.; CASADEVALL, A.; GHANNOUM, M. A.; PERFECT J. R.. Extracellular Phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology**, v.39, n.1, p. 166-75, 2001.

COX, G. M.; MUKHERJEE, J.; COLE, G. T.; CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. **Infection and Immunity**, v. 68, n.2, p. 443-448, 2000.

CRUZ, M. C.; FOX, D. S.; HEITMAN, J. Calcineurin is required for hyphal elongation during mating and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*. **The EMBO Journal**., v.20, n.5, p.1020-32, 2001.

CURTIS, P. H.; HALLER, J. A.; DE JUAN, E. An unusual case of cryptococcal endophthalmitis. **Retina**, v.15, p. 300-304, 1995.

DADACHOVA, E.; BRYAN, R. A.; HOWELL, R. C.; SCHWEITZER, A. D.; AINSEN, P; NOSANCHUCK, J. D.; CASADEVALL, A. The radioprotective properties of fungal melanin are a function of its chemical composition, stable radical presence and spatial arrangement. **Pigment Cell Melanoma Research**, v. 21, n. 2, p. 192-199, 2008.

DAMBRÓS, B. P. **Variabilidade genética de *Cryptococcus neoformans* isolado de pacientes HIV positivos atendidos no Hospital Nereu Ramos de Florianópolis**, Santa Catarina. 2005. 85 f.



Dissertação (Mestrado-Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2005.

DAMBRÓS, BP, SANTOS, J. I.; STEINDEL, M. **Tipagem Molecular de fungos do gênero *Cryptococcus neoformans* através da técnica de PCR-RFLP** - PI 0602571-4 A8 19/06/2006.

DARZÉ, C.; LUCENA, R.; GOMES, I.; MELO, A. Características clínicas laboratoriais de 104 casos de meningoencefalite criptocócica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n.1, p. 21-6, 2000.

DROMER, F., VARMA, A.; RONIN, O.; MATHOULIN, S.; DUPONT, B. Molecular typing of *Cryptococcus neoformans* serotype D clinical isolates. **Journal Clinical Microbiology**, v.32, p.2364–2371, 1994.

D'SOUZA, C. A.; HAGEN, F.; BOEKHOUT, T.; COX, G. M.; HEITMAN, J. Investigation of the basis of virulence in serotype A strains of *Cryptococcus neoformans* from apparently immunocompetent individuals. **Current Genetics**, v. 46, n.2 p. 92-102, 2004.

D'SOUZA, C.A.; HEITMAN, J. It infects me, it infects me not: phenotypic switching in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Journal Clinical Investigation.**, v.108, n.11, p.1577-1578. 2001.

ELLIS, D. H.; PFEIFFER, T. J. Ecology, life cycle, and infectious propagule of *Cryptococcus neoformans*. **Lancet**, v.336, p.923-925, 1990.

ELLIS, D.; MARRIOTT, D.; HAJJEH, R. A.; WARNOCK, D.; MEYER, W. BARTON R. Epidemiology: surveillance of fungal infections. Review. **Medical Mycology**, v. 38, Suppl 1, p. 17382, 2000.

FEDERAÇÃO CATARINENSE DE MUNICÍPIOS. Associações municipais. Disponível em: [www.fecam.org.br](http://www.fecam.org.br). Acesso em: 15/06/2016

FELDMESSER, M.; KRESS, Y.; MEDNICK, A.; CASADEVALL, A. The effect of the echinocandin analogue caspofungin on cell wall glucan synthesis by *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Infection Diseases**, v.182, n.6, p. 1791-5, 2000.

FERNANDES, O. F. L.; PASSOS, X. S.; SOUZA, L. K. H.; MIRANDA, A. T. B.; CERQUEIRA, C. H. P. V.; SILVA, M. R. R. In Vitro susceptibility characteristics of *Cryptococcus neoformans* varieties from AIDS patients in Goiânia, Brazil. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, n.6, p.839-841, 2003.

FILIÚ, W. F. O.; WANKE, B.; AGÜENA, S. M.; VILELA, V. O.; MACEDO, R. C. L.; LAZÉRA, M. Cativo de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, p. 591-595, 2002.

FRANZOT, S. P.; HAMDAN, J. S.; CURRIE, B. P.; CASADEVALL, A. - Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* in Brazil and the United States: evidence for both local genetic differences and a global clonal population structure. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, p. 2243- 2251, 1997.

FRANZOT, S. P.; SALKIN, I. F.; CAASEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. **Journal of clinical Microbiology**, v. 37, p. 838-840, 1999.

FRASES, S.; NIMRICHTER, L.; VIANA, N. B.; NAKOUZI, A.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide and exopolysaccharide fractions manifest physical, chemical, and antigenic differences. **Eukaryotic Cell**, v.7, n.2, p.319-327, 2008.

FRIES BC, TABORDA CP, SERFASS E, CASADEVALL A. Phenotypic switching of *Cryptococcus neoformans* occurs in vivo and influences the outcome of infection. **Journal of Clinical Investigation**, v.108, n.11, p.1639-48, 2001.

GALANIS, E.; MACDOUGALL, L.; KIDD, S.; MORSHED, M. Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999 - 2007. **Emerging Infectious Disease**, v. 16, p. 251-257, 2010.

GARCIA-RIVERA, J.; CASADEVALL, A. Melanization of *Cryptococcus neoformans* reduces its susceptibility to the antimicrobial effects of silver nitrate. **Medical Mycology**, v.39, n.4, p.353-357, 2001.

GATES, M. A.; THORKILDSON, P.; KOZEL, T. R. Molecular architecture of the *Cryptococcus neoformans* capsule. **Molecular Microbiology**, v. 52, n.1, p.13-24, 2004.

GHANNOUM, M. A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, n.1, p.122-143, 2000.

GILES, S. S.; DAGENAIS, T. R.; BOTTS, M. R.; KELLER, N. P.; HULL, C. M. Elucidating the pathogenesis of spores from the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 77, p. 3491-3500, 2009.

GOLDMAN, D.L.; FRIES, B.C.; FRANZOT, S. P.; MONTELLA, L.; CASADEVALL, A. Phenotypic switching in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* is associated with changes in virulence and pulmonary inflammatory response in rodents. **Proceedings of National Academy of Science of the USA**, v.8, n.95(25), p.14967-72. 1998.

GRANGER, D. L., PERFECT, J. R., DURACK, D. T. Virulence of *Cryptococcus neoformans*. Regulation of capsule synthesis by carbon dioxide. **Journal of Clinical Investigation**, v.76, p.508-516. 1985.

GULLO; F. P.; ROSSI, S. A.; SARDI, J. C. O.; TEODORO, V. L. I.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. Cryptococcosis: epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment. **Europe Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 32, n. 11, p. 1377-1391, 2013.

HEITMAN, J.; KOZEL, T. R.; KWON-CHUNG, J. K.; PERFECT, J. R.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus* from human pathogen to model yeast. 2. ed. Washington: **ASM Press**, 2011, 620 p.

HUFFNAGLE, G. B.; CHEN, G. H.; CURTIS, J. L.; MCDONALD, R. A.; STRIETER, R. M.; TOEWS, G. B. Down-regulation of the afferent phase of T cell-mediated pulmonary inflammation and immunity by a high melanin-producing strain of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Immunology**. v.1, n.155(7), p.3507-16, 1995.

IBGE, Diretoria de Estatística, Geografia e Cartografia, 2009.

IKEDA, R.; SHINODA, T.; FUKAZAWA, Y.; KAUFMAN, L.;  
Antigenic characterization of *Cryptococcus neoformans* serotypes and  
its application to serotyping of clinical isolates. **Journal Clinical  
Microbiology**, v.16, n.1, p.22-9. 1982.

ITO-KUWA, S.; NAKAMURA, K.; AOKI, S.; VIDOTTO, V. Serotype  
identification of *Cryptococcus neoformans* by multiplex PCR. **Mycoses**,  
v. 50, p. 277-281, 2007.

JESUS, M. D.; NICOLA, A. M.; CHOW, S. K.; LEE, I. R.; NONG, S.;  
SPECHT, C. A.; LEVITZ, S. M.; CASADEVALL, A.  
Glucuronoxylomannan, galactoxylomannan, and mannoprotein occupy  
spatially separate and discrete regions in the capsule of *Cryptococcus  
neoformans*. **Virulence**, v. 1, p. 500-508, 2010.

KAWAKAMI K. Regulation by innate immune T lymphocytes in the  
host defense against pulmonary infection with *Cryptococcus  
neoformans*. **Japanese Journal Of Infection Disease**, v. 57, n.4, p.137-  
45. 2004.

KIDD, S. E.; HAGEN, F.; TSCHARKE, R. L.; HUYNH, M.;  
BARTLETT, K. H.; FYFE, M.; MACDOUGALL, L.; BOEKHOUT, T.;  
KWON-CHUNG, K. J.; MEYER, W. A rare genotype of *Cryptococcus  
gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British  
Columbia, Canada). **Proceedings of the National Academy of  
Sciences of the United States of America**, v.101, p. 17258–17263,  
2004.

KNOKE, M.; SCHWESINGER, G. One hundred years ago: the history  
of cryptococcosis in Greifswald. Medical mycology in the nineteenth  
century. **Mycoses**, v.37, p. 229-233, 1994.

KOBAYASHI, C. C. B. A.; SOUZA, L. K. H.; FERNANDES, O. F. L.;  
BRITO, S. L. A.; SILVA, A. C.; SOUSA, E. D.; SILVA, M. R. R.  
Characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from urban  
environmental sources in Goiânia, Goiás, Brazil. **Revista do Instituto  
de Medicina Tropical**, v. 7, p. 203-207, 2005.

KON, A. S.; GRUMACH, A. S.; COLOMBO, A. L.; PENALVA, A. C. O.; WANKE, B.; TELLES, F. Q.; SEVERO, L. C.; ARANHA, L. F.; LAZÉRA, M. S.; RESENDE, M. R.; SALMITO, M. A.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; FERREIRA, M. S.; SILVA-VERGARA, M. L.; ANDRADE, N. M. P.; TRABASSO, P.; MENDES, R. P.; MARTINEZ, R.; PONZIO, V. Consenso em criptococose: 2008. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p. 524-544, 2008.

KOZEL, T. R.; PFROMMER, G. S.; GUERLAIN, A. S.; HIGHISON, B. A.; HIGHISON, G. J. Strain variation in phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*: dissociation of susceptibility to phagocytosis from activation and binding of opsonic fragments of C3. **Infection and Immunity**. v.56, n.11, p.2794-800, 1988.

KRONSTAD, J. M.; ATTARIAN, R.; CADIEUX, B.; CHOI, J.; D'SOUZA, C. A.; GRIFFITHS, E. J.; GEDDES, J. M. H.; HU, G.; JUNG, W. H.; KRETSCHMER, M.; SAIKIA, S.; WANG, J. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. **National Review of Microbiology**, v. 9, p. 193-203, 2011.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. The yeasts: a taxonomic study. 5th ed. New York: **ACM Press**, 2011. p. 1661-1662.

KWON-CHUNG, K. J. A new genus, *Filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. **Mycologia**, v.67, p.1197-1200, 1975.

KWON-CHUNG, K.J. A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. **Mycologia**, v. 68, p.943-946, 1976a.

KWON-CHUNG, K. J. Morphogenesis of *Filobasidiella neoformans*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans*. **Mycologia**, v.68, p.821-833, 1976b.

KWON-CHUNG, K. J., BENNETT, J. E. Distribution of alpha and a mating types of *Cryptococcus neoformans* among natural and clinical isolates. **American Journal Epidemiology**, v. 108, p. 337-340, 1978.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. Cryptococcosis. In: KWON-CHUNG, K. J. BENNETT, J. E., eds. **Medical Mycology**. Philadelphia, Lea; Febiger, p. 397-445, 1992.

KWON-CHUNG, K. J.; EDMAN, J. C.; WICKES, B. L.; Genetic association of mating types and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 60, n.2, p. 602-5. 1992.

KWON-CHUNG, K. J.; HILL, W. B.; BENNETT, J. E. New, special stain for histopathological diagnosis of cryptococcosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.13, n.2, p. 383-7. 1981.

KWON-CHUNG, K. J.; POLACHEK, I.; BENNETT, J. E. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotype B and C). **Journal of Clinical Microbiology**, v.15, p. 535-537, 1982.

KWON-CHUNG, K. J.; RHODES, J. C. Encapsulation and melanin formation as indicators of virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 51, p. 218-223, 1986.

LACAZ, C. S; PORTO, E; HEINS-VACCARI, E. M; MELO, N. T. **Tratado de Micologia Médica**. 9. ed. São Paulo, Sarvier, 2002.

LALLOO, U. G.; AMOD, F. C. HIV-associated Tuberculosis and Cryptococcosis in Resource-limited Settings. **Current HIV/AIDS Rep**.v.2, n.3, p.116-121. 2005.

LATOUCHE, G. N.; HUYNH, M.; SORRELL, T. C.; MEYER, W. PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the Phospholipase B (PLB1) Gene for Subtyping of *Cryptococcus neoformans* Isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 2080-2086, 2003.

LAZERA, M. S.; CAVALCANTI, M. A.; TRILLES, L.; NISHIKAWA, M. M.; WANKE, B. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*—evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow. **Medical Mycology**, v.36, n.2, p.119-22. 1998.

LAZERA, M. S.; PIRES, F. D.; CAMILLO-COURA, L.; NISHIKAWA, M. M.; BEZERRA, C. C.; TRILLES, L.; WANKE, B. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. **Journal Medical and Veterinary Mycology**, v.34, n.2, p.127-31. 1996.

LÁZERA, M. S.; SALMITO-CAVALCANTI, M. A.; LONDERO, A. T.; TRILLES, L.; NISHIKAWA, M. M.; WANKE, B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. **Medical Mycology**, v. 38, p.379-383, 2000.

LÁZERA, M. S.; WANKE, B.; NISHIKAWA, M. M. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the City of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, vol. 31, p. 449-454, 1993.

LEAL, A. L.; FAGANELLO, J.; BASSANESI, M. C.; VAINSTEIN, M. H. *Cryptococcus* species identification by multiplex PCR. **Medical Mycology**, v. 46, p. 377-383, 2008.

LENGELER, K. B.; DAVIDSON, R. C.; D'SOUZA, C.; HARASHIMA, T.; SHEN, W. C.; WANG, P.; PAN, X.; WAUGH, M.; HEITMAN, J. Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, v.64, n.4, p.746-85, 2000.

LEVITZ, S. M. The ecology of *Cryptococcus neoformans* and the epidemiology of cryptococcosis. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 13, n. 6, p. 1163-1169, 1991.

LIAW, S. J.; WU, H. C.; HSUEH, P. R. Microbiological characteristics of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* in Taiwan - serotypes, mating types, molecular types, virulence factors, and antifungal susceptibility. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 6, p. 696-703, 2009.

LIN, X.; HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Annual Review of Microbiology**, v. 60, p. 69-105, 2006.

LINDENBERG, A. S. C.; PANIAGRO, A. M. M, LÁZERA, M. S, MONCADA, P. M. F; BONFIM, G. F.; NOGUEIRA, S. A.; WANKE, B. Clinical and epidemiological features of 123 cases of cryptococcosis in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.50, p.75-78, 2008.

LIU, G. Y.; NIZET, V. Color me bad: Microbial pigments as virulence factors. **Trends in Microbiology**, v. 17, p. 406-413, 2009.

LIU, L., TEWARI, R. P., WILLIAMSON, P. R.. Laccase protects *Cryptococcus neoformans* from Antifungal Activity of Alveolar Macrophages. **Infection and Immunity**, v.67, p. 6034-6039. 1999.

LOPERENA-ALVAREZ, Y; REN, P; LI, X; SCHOONMAKER-BOOP, D. J.; RUIZ, A. Genotypic characterization of environmental isolates of *Cryptococcus gattii* from Puerto Rico. **Mycopathologia**, v. 170 (4), p. 279-285, 2010.

LUGARINI, C. **Isolamento de *Cryptococcus neoformans* a partir de excretas de passeriformes e psittaciformes no estado do Paraná.** 2007. 107f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, 2007.

LUGARINI, C.; GOEBEL, C. S.; CONDAS, L. A.; MURO, M. D.; DE FARIAS, M. R.; FERREIRA, F. M.; VAINSTEIN, M. H. *Cryptococcus neoformans* isolated from passerine and psittacine bird excreta in the State of Paraná, Brazil. **Mycopathologia**, v. 166, p. 61-69, 2008.

MA, H.; MAY, R. C. Virulence in *Cryptococcus* species. **Advances in Applied Microbiology**, v. 67, p. 131-190, 2009.

MA, L. L.; MODY, C. H. When there is a fungus among us, what makes it virulent? **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**. v. 26, p. 273-276, 2002.

MARRA, R. E.; HUANG, J. C.; FUNG, E.; NIELSEN, K.; HEITMAN, J.; VILGALYS, R.; MITCHELL, T. G. A genetic linkage map of *Cryptococcus neoformans* variety *neoformans* serotype D (*Filobasidiella neoformans*). **Genetics**, v. 167, n.2, p. 619-31, 2004.



MAZZA, M.; REFOJO, N.; BOSCO-BORGEAT, M. E.; TAVERNA, C. G.; TROVERO, A. C.; ROGÉ, A.; DAVEL, G. *Cryptococcus gattii* in urban from cities in North-eastern Argentina. **Micoses**, v. 56, p. 646-650, 2013.

MCCLELLAND, C. M.; CHANG, Y. C.; VARMA, A.; KWON-CHUNG, K. J. Uniqueness of the mating system in *Cryptococcus neoformans*. **Trends in Microbiology**, v.12, n.5, p.208-12, 2004.

MCFADDEN, D. C.; DE JESUS, M.; CASADEVALL, A. The Physical properties of the capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* suggest features for capsule construction. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 1868-1875, 2006.

MENEZES, T. ; SCAIN, G. ; QUADROS, R. M. ; MILETTI, L. C. ; SOUZA, A. L. ; MIGUEL, R. L. ; MARQUES, S. M. T. . *Cryptococcus* spp. em excretas de pombos (*Columbia livia*) de áreas públicas de Lages, Santa Catarina, Brasil. Pelotas – RS, **Science and Animal Health**, v. 2, p. 102-114, 2014.

MERSHON-SHIER, K. L.; VASUTHASAWAT, A.; TAKAHASHI, K.; MORRISON, S. L.; BEENHOUWER, D. O. In vitro C3 deposition on *Cryptococcus* capsule occurs via multiple complement activation pathways. **Molecular Immunology**, v. 48, p. 2009-2018, 2011.

MEYER, W.; CASTAÑEDA, A., JACKSON, S. et al. - Molecular typing of Iberoamerican *Cryptococcus neoformans* isolates. **Emergent Infectious Diseases**, v. 9, p.189-195, 2003.

MEYER, W.; MARSZEWSKA, K.; AMIRMOSTOFIAN, M.; IGREJA, RP.; HARDTKE, C.; METHLING, K.; VIVIANI, M. A.; CHINDAMPORN, A.; SUKROONGREUNG, S.; JOHN, M. A.; ELLIS, D. H.; SORRELL, T. C. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var.*neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA-a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. **Electrophoresis**, v.20, n.8, p.1790-9. 1999.

MEYER, W.; TRILLES, L. Genotyping of the *Cryptococcus neoformans*/C. *gattii* species complex. **Australian Biochemist**, v. 41, n. 1, p. 11-15, 2010.

MISSALL, T. A.; MORAN, J. M.; CORBETT, J. A.; LODGE, J. K. Distinct stress responses of two functional laccases in *Cryptococcus neoformans* are revealed in the absence of the thiol-specific antioxidant Tsa1. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 1, p. 202–208, 2005.

MITCHELL, T. G.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the era of AIDS 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clinical Microbiology**, v. 8, p. 515-548, 1995.

MOREIRA, T. A.; FERREIRA, M. M. S.; RIBAS, R. M.; BORGES, A. S. Criptococose: estudo clínico-epidemiológico, laboratorial e das variedades do fungo em 96 pacientes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 255-258, 2006.

MORROW, C. A.; LEE, I. R.; CHOW, E. W. L.; ORMEROD, K. L.; GOLDINGER, A.; BYRNES III, E. J.; NIELSEN, K.; HEITMAN, J.; SCHIRRA, H. J.; FRASER, J. A. A unique chromosomal rearrangement in the *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* type strain enhances key phenotypes associated with virulence. **MBio**, v. 3, n. 2, p. 1-11, 2012.

NAKAMURA, Y.; KANO, R.; WATANABE, S.; HASEGAWA, A. Molecular analysis of CAP59 gene sequences from five serotypes of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n.3, p.992-5, 2000.

NGAMSKULRUNGROJ, P.; MEYER, W. Melanin production at 37°C is linked to the high virulent *Cryptococcus gattii* Vancouver Island outbreak genotype VGIIa. **Australasian Mycologist**, v. 28, p. 9-14, 2009.

NISHIKAWA, M. M.; LAZERA, M. S.; BARBOSA, G.G.; TRILLES, L.; BALASSIANO, B. R.; MACEDO, R. C. BEZERRA, C. C.; PEREZ, M. A.; CARDARELLI, P.; WANKE, B. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. **Journal Clinical Microbiology**, v. 41, p. 73-77, 2003.

O'MEARA, T. R.; COWEN, L. E. Hsp90-dependent regulatory circuitry controlling temperature-dependent fungal development and virulence. **Cellular Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 473481, 2014.

PAPPALARDO, M. C.; MELHEM, M. S. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n.6, p.299-305, 2004.

PASSONI, L. F. C. Wood, animals and human beings as reservoirs for human *Cryptococcus neoformans* infection. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 16, p. 77-81, 1999.

PEDROSO, R. S.; FERREIRA, J. C.; CANDIDO, R. C. The isolation and characterization of virulence factors of *Cryptococcus* spp. from saprophytic sources in the city of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. **Microbiological Research**, v. 164, p. 221-227, 2009.

POLACHECK, I., HEARING, V.J., KWON-CHUNG, K.J. Biochemical studies of phenoloxidase and utilization of catecholamines in *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Bacteriology**, v. 150, p. 1212-1220, 1982.

PROGRAMA DAS NAÇÕES UNIDAS PARA O DESENVOLVIMENTO – BRASIL. **Atlas do desenvolvimento Humano no Brasil**. Disponível em: [www.pnud.org.br](http://www.pnud.org.br) Acesso em: 15/06/2016

PUKKILA-WORLEY, R.; GERRARD, Q. D.; KRAUS, P. R.; BOILY, M. J.; DAVIS, M. J.; GILES, S. S.; COX, G. M.; HEITMAN, J.; ASPAUGH, J. A. Transcriptional network of multiple capsule and melanin genes governed by the *Cryptococcus neoformans* cyclic AMP cascade. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 1, 2005.

REIS-FILHO, J. B.; NEVES, A. C.; ZYMBERG, S. T. ; OLIVEIRA, R.M.C. - O líquido cefalorraquiano inicial nas meningoencefalites por *Cryptococcus neoformans*. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 27, p. 173-178, 1985.

REY, A.; KLAUS, B.; LENGELER; HEITMAN, J. Diploid Strains of the Pathogenic Basidiomycete *Cryptococcus neoformans* Are Thermally Dimorphic **Fungal Genetics and Biology**, v. 29, p. 153–163. 2000.

REZENDE, C.; MUNHÓZ, C. J. M.; ALMEIDA, G. G.; Investigação Ambiental de *Cryptococcus neoformans* na Cidade de Votuporanga – São Paulo. **News Lab**, v. 87 p. 88-94, 2008.

RICHARDSON, M. D.; WARNOCK, D. W. Fungal **Infection:diagnosis and management**. Blackwell Scientific publications, 1993.

ROBERT, V. A.; CASADEVALL, A. Vertebrate endothermy restricts most fungi as potential pathogens. **Journal of Infectious Diseases**, v. 200, p. 1623-1626, 2009.

ROMEO, O.; SCORDINO, F.; CHILLEMI, V.; CRISEO, G. *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* species complex in Southern Italy: an overview on the environmental diffusion of serotypes, genotypes and mating-types. **Mycopathologia**, v. 174, n. 4, p. 283-291, 2012.

SANTOS, W. R.; MEYER, W.; WANKE, B.; COSTA, S. P.; TRILLES, L.; NASCIMENTO, J. L.; Primary endemic *Cryptococcosis gattii* by molecular type VGII in the state of Pará, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 813-818. 2008.

SCAIN, G. **Prevalência de *Cryptococcus neoformans* em fezes de pombos (*Columba livia*) nas praças públicas da cidade de Lages**, Santa Catarina. 2011. 40 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Lages, 2011.

SEBRAE - **Santa Catarina em Números**: Macrorregião Serra Catarinense/Sebrae/SC.\_ Florianópolis: Sebrae/SC, 139p, 2013.

SHADOMY, H. J. Clamp connections in two strains of *Cryptococcus neoformans*, In: AHEARN, D. G. (ed.), **Recent Trends in Yeast Research**. Georgia State University, Atlanta, p. 67-72, 1970.

SIDRIM J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais de micologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p.76-89.

SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica. 1  ed. **Guanabara Koogan**, p. 1999.

SILVA, J. O.; CAPUANO, D. M. Ocorrência de *Cryptococcus spp* e de parasitas de interesse em saúde pública, nos excretas de pombos na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto Adolf Lutz**, v. 67, p. 137-141, 2008.

SILVA, J. O.; COSTA, P. P.; RECHE, S. H. C. Manutenção de leveduras por congelamento a – 20°C, **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 40, p.73-74, 2008.

SORRELL, T. C. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. **Medical Mycology**, v. 39, p.155-168, 2001.

SOUZA, L. K. H.; COSTA, C. R.; FAGNELLO, J.; VAINSTEIN, M. H. CHAGAS, A. L. B, et al. Molecular typing and antifungal susceptibilities of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* species complex isolates in Goiania, Brazil. **Mycoses**, v.53, p. 62-67. 2010.

SPITZER, E. D., S. G. SPITZER, L. F. FREUNDLICH, A. CASADEVALL. Persistence of initial infection in recurrent *Cryptococcus neoformans* meningitis. **Lancet**, v.341, p.595–596, 1993.

SPITZER, S. G. SPITZER, E. D. Characterization of the CNRE-1 family of repetitive DNA elements in *Cryptococcus neoformans*. **Gene**, v. 144, p. 103–106, 1994.

STAIB, F. *Cryptococcus neoformans* and *Guizotia abyssinica* (syn.G.oleífera) Farbreaktion fur (*Cryptococcus neoformans*). **Zentrabl Bakteriologie**, v. 148, p. 466-475, 1962a.

STAIB, F. Vogelkot, ein Nahrs substrat fur die Gattung *Cryptococcus neoformans*. **Mykosen**, v. 11, p. 267-272, 1962b.

STEENBERGEN JN, SHUMAN HA, CASADEVALL A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. **Proceedings of National Academy of Science of the USA**, v.18, n.26, p.15245-50. 2001.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; RADONJIC, I.; DIMITRIJEVIC, V.; SVABIC-VLAHOVIC, M. Ground red hot pepper agar in the isolation and presumptive identification of *Cryptococcus neoformans*. **Mycoses**, v.45, n.9-10, p.384-8, 2002.

THOMPSON, H. J. Not your "typical patient": cryptococcal meningitis in an immunocompetent patient. **Journal of Neurosciences and Nursery**. v.37, n.3, p.144-8. 2005.

TRILLES, L.; LAZÉRA, M. S.; WANKE, B.; OLIVEIRA, R. V.; BARBOSA, G. C.; NISHIKAWA, M. M.; MORALES, B. P.; MEYER, W. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 455-462, 2008.

TSCHARKE, R. L.; LAZERA, M.; CHANG, Y. C.; WICKES, B. L.; KWON-CHUNG, K. J.; Haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans* is not mating type alpha-specific. **Fungal Genetics and Biology**, v. 39, n.3, p. 230-7. 2003.

TSENG, H.; LIU, C.; HO, M.; LU, P.; LO, H.; LIN, Y.; CHO, W.; CHEN, Y. Microbiological, epidemiological, and clinical characteristics and outcomes of patients with cryptococcosis in Taiwan, 1997-2010. **Plos One**, v. 8, n. 4, p. 1-10, 2013.

TUCKER, S. C.; CASADEVALL, A. Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. **Proceedings of National Academy of Science of the USA**, v. 5, n.99(5), p. 3165-70, 2002.

VAN DUIN, D.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J.D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. **Antimicrobial Agents Chemother**. v.46, n. 11, p. 3394-400. 2002.

VARTIVARIAN, S. E.; ANAISSIE, E. J.; COWART, R.E.; SPRIGG, H. A.; TINGLER, M.J.; JACOBSON, E. S. Regulation of cryptococcal capsular polysaccharide by iron. **Journal of Infection Diseases**, v.167, p.186–190, 1993.

VECCHIARELLI, A. Immunoregulation by capsular components of *Cryptococcus neoformans*. **Medical Mycology**, v.38, n.6, p.407-17. 2013.

VELAGAPUDI, R.; HSUEH, Y, P.; GEUNES-BOYER, S.; WRIGHT, J. R.; HEITMAN, J. Spores as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 77, p. 4345-4355, 2009.

WANG, Y.; AISEN, P.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. **Infection and Immunity**, v. 63, n.8, p. 3131-6, 1995.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen- and oxygen-derived oxidants. **Infection and Immunity**, v.62, n.7, p.3004-7, 1994.

WICKES, B. L. The role of mating type and morphology in *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **International Journal of Medical Microbiology**, v.292, n.(5-6), p.313-29, 2002.

XU, J.; VILGALYS, R.; MITCHELL, T. G. Multiple gene genealogies reveal recent dispersion and hybridization in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Ecology**, v.9, n.10, p.1471-81, 2000.

YAMAMURA, A. A. M.; FREIRE, R. L.; YAMAMURA, M. H.; FELIX, A.; TARODA, A. Estudo dos nichos ecológicos de leveduras patogênicas das espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* na cidade de Londrina, PR. **Ciências Agrárias**, v. 34, p. 793-804, 2013.

ZARAGOZA, O.; CASADEVALL, A. Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*. **Biology Procedures Online**, v.6, p.10-15, 2004.

ZERPA, R.; HUICHO, L.; GUILLEN, A. Modified India ink preparation for *Cryptococcus neoformans* in cerebrospinal fluid specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n.9, p. 2290-1, 1996.

ZHU, X.; WILLIAMSON, P. R. Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans* in press. **FEMS Yeast Research**, v.5, n.1, p.1-10. 2004.

ZHU, X.; GIBBONS, J.; GARCIA-RIVERA, J.; CASADEVALL, A.; WILLIAMSON, P. R. Laccase of *Cryptococcus neoformans* Is a Cell Wall-Associated Virulence Factor. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 5589-5596, 2001.